

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DU RÔLE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DANS LA  
MAINTENANCE À LONG TERME DE L'ORGANISATION DU  
SYSTÈME NERVEUX CHEZ *CAENORHABDITIS ELEGANS*

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAITRISE EN BIOCHIMIE

PAR  
VALÉRIE FONTAINE

NOVEMBRE 2021

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Pour commencer, je tiens à exprimer ma profonde gratitude et à sincèrement remercier ma directrice de maîtrise, la Pre Claire Bénard, de m'avoir soutenue tout au long de ce projet. Merci de m'avoir accordé ta confiance et de m'avoir permis de grandir au cours ma maîtrise. Au cours des deux dernières années, tu m'as permis de grandir et de prendre confiance en moi, en plus de m'aider à gérer mon anxiété. Tu m'as appris que prendre soin de moi était essentiel pour mener mon travail à bien et que c'est tout à fait normal d'avoir des moments de faiblesse. Merci d'avoir cru en mes capacités, quand moi-même je ne les voyais pas, et de toujours avoir pris le temps de m'écrire des lettres de recommandation.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde reconnaissance à Lise Rivollet, notre gestionnaire de laboratoire pour son temps et sa patience lorsque je rencontrais des problèmes avec la PCR *mig-6*. Merci pour ton infinie gentillesse et ton perpétuel sourire. Tu es une personne formidable qui est toujours disponible et chaleureuse. J'espère, un jour, être une aussi bonne lab manager que toi... Merci infiniment pour tout!

J'en viens à remercier chaleureusement mes collègues de laboratoire qui ont été une réelle source d'inspiration. Merci à Malika Nadour pour ta bonne humeur et pour ta patience lors de ma formation. Merci de m'avoir transmis tes connaissances et ta passion pour notre petit ver, ce fut un réel plaisir d'apprendre à tes côtés. Un énorme merci à ma collègue Marie Biard qui m'a bien aidé lors de mes débuts avec *C. elegans*, mais aussi avec le logiciel R. Merci d'avoir répondu patiemment à toutes mes

questions. Merci aussi à tous les membres du laboratoire de m'avoir accueillie à bras ouverts.

Un merci tout spécial à Andrea Thackeray, de la University of Massachusetts Medical School (États-Unis), pour avoir envoyé quelques clones supplémentaires d'ARNi. Grâce à ton aide en ce temps de pandémie j'ai pu avoir de très beaux résultats.

Merci aussi à Devyn Oliver de nous avoir partagé son protocole pour la quantification des synapses.

Je remercie aussi Carolina Ferrer de m'avoir donné ma chance à la maîtrise en étude littéraire. Le projet que tu m'as confié sur la représentation des sciences dans la littérature m'a permis de revenir à mon premier amour : les sciences. Je t'en serai éternellement reconnaissante.

Pour finir, j'aimerais remercier ma famille et mes amis qui ont été d'un très grand soutien.

À Vincent et Manon, les deux meilleurs parents du monde, qui ont toujours fait preuve d'une très grande patience à mon égard, surtout quand je leur parlais des nouveaux projets que j'avais en tête. Merci d'être toujours là pour me soutenir, m'encourager et me conseiller ;

À Maxime, l'amour de ma vie qui me soutient depuis plus de 9 ans maintenant. Merci pour ton amour inconditionnel et pour tout, absolument tout. Merci de faire partie de ma vie et d'avoir pris le temps de comprendre mon projet. Ton énergie et ta confiance en moi m'aident tous les jours à devenir une meilleure personne. Tout simplement merci ;

À Charles et Réjeanne, mes grands-parents qui m'ont patiemment écouté parler de mes vers verts, sans vraiment comprendre ce que je racontais. Je ne trouverai jamais les mots pour dire à quel point je vous suis reconnaissante pour absolument tout ;

À Roger et Bernadette, mes grands-parents sans qui je n'aurais jamais pu faire des études aussi variées. Merci de m'avoir insufflé votre curiosité et de m'avoir soutenue

dans la poursuite de mes études. Merci de m'avoir transmis votre passion pour la généalogie, ce qui m'a permis de développer une passion pour la génétique et la transmission.

À mes cousines, Marylyn et Stéphanie, mon cousin Nicolas, ma tante, Chantal, et mon oncle, Michel de votre soutien.

À Marianne, ma meilleure amie qui a toujours été là pour moi malgré l'océan qui nous a séparées pendant plusieurs années. Ma chère, je suis si fière de tout ce que tu as accompli, tu vas être une sage-femme formidable! Cette année nous terminons toutes les deux nos études et j'ai hâte de vivre tous les beaux moments qui nous attendent.

À Marilyne, Kassem, Carl, Zahra et Sigrid pour m'avoir fait rire et pour avoir accepté tous mes petits travers...; À Souleimen Jmii, qui, sans le savoir, m'a donné le courage de faire une grande partie de mes figures avec Illustrator. Merci aussi de m'avoir encouragé durant la rédaction de mon mémoire.

À tous mes camarades de classe pour leur bonne humeur à toute épreuve.

Finalement, merci à mon petit chat Lindt, qui pendant l'écriture de ces remerciements, et de tout mon mémoire, est resté à mes côtés en me donnant des câlins et en utilisant mes mains et mes bras comme oreiller pendant que j'écrivais. Merci pour ton omniprésence!

*Ces travaux ont été appuyés par des fonds de recherches de IRSC, du CRSNG, des FRQS et des NIH pour Claire BÉNARD, ainsi que par les bourses d'excellence de soutien à la réussite de la Faculté des sciences de l'UQAM et de la Fondation de l'UQAM pour Valérie FONTAINE.*

## DÉDICACE

*À Pierre-Joseph Fontaine,  
Inventeur et héros.*

*À Xavier.*

*« All our dreams can come true,  
If we have the courage to pursue them »  
- Walt Disney*

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES .....	xii
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS .....	xiii
RÉSUMÉ.....	xiv
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1 Mise en contexte et problématique .....	1
1.2 But du projet de recherche .....	2
1.3 <i>C. elegans</i> un modèle de choix .....	4
1.3.1 Bref historique de <i>C. elegans</i> .....	4
1.3.2 Avantages de l'utilisation de <i>C. elegans</i> .....	6
1.4 La matrice extracellulaire chez le nématode <i>C. elegans</i> .....	11
1.5 Le système nerveux chez <i>C. elegans</i> .....	14
1.5.1 Les neurones .....	15
1.5.2 Les synapses .....	15
1.6 La maintenance de l'organisation du système nerveux.....	16
1.6.1 Qu'est-ce que la maintenance neuronale ? .....	17
1.6.2 Les facteurs de la maintenance neuronale.....	18
1.6.2.1 Les facteurs permettant la maintenance des fascicules axonaux et des ganglions de la tête.....	19
1.6.2.2 Les facteurs permettant la maintenance des structures synaptiques .....	22
1.7 Objectifs de recherche .....	24
1.7.1 Analyse systématique de gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire pour tester leur implication dans la	

maintenance de l'organisation neuronale.....	25
1.7.2 Analyse systématique de gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire pour tester leur implication dans la maintenance de l'architecture des structures présynaptiques de motoneurones .....	25
CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	26
2.1 Souches de nématodes et génétique .....	26
2.2 Préparation préalable pour les expériences d'ARN interférence.....	27
2.2.1 Préparation des cultures bactériennes et extraction d'ADN .....	28
2.2.2 Séquençage .....	29
2.3 ARN interférence .....	30
2.3.1 Description des bases du système .....	30
2.3.2 Culture bactérienne .....	31
2.3.3 Préparation des plaques NGM pour l'ARNi .....	32
2.3.4 Synchronisation des nématodes .....	32
2.4 Microscopie et observations de la neuroanatomie .....	35
2.4.1 Analyse des ganglions de la tête : les neurones ASH/ASI et le neuropile.....	36
2.4.2 Observation de la fluorescence de LAM-2 et de EMB-9.....	37
2.4.3 Analyse des structures présynaptiques de neurones GABAergiques de la corde dorsale .....	37
2.5 Traitement des images .....	38
2.6 Quantifications et analyses statistiques .....	40
CHAPITRE III RÉSULTATS.....	41
3.1 Stratégie du crible par ARNi.....	41
3.2 Analyse des effets de la déplétion de gènes de la matrice extracellulaire sur l'organisation des ganglions de la tête .....	47
3.2.1 La laminine $\gamma$ semble jouer un rôle dans la maintenance neuronale .....	50

3.2.2 Le gène <i>gon-1</i> joue un rôle dans la maintenance neuronale .....	54
3.2.3 La réduction de la fonction de <i>gon-1</i> modifie la distribution du collagène et de la laminine.....	55
3.2.4 La déplétion post-développementale de <i>mig-6</i> semble confirmer son implication dans la maintenance neuronale.....	57
3.3 Le rôle de la matrice extracellulaire dans la distribution des synapses de la corde dorsale .....	58
CHAPITRE IV DISCUSSION .....	64
4.1 Trois protéines supplémentaires impliquées dans la maintenance à long terme de l'organisation des ganglions de la tête chez <i>C. elegans</i> .....	64
4.1.1 Le rôle du gène <i>lam-2</i> dans la maintenance neuronale .....	65
4.1.1.1 La laminine $\gamma$ affecte le positionnement du neuropile .....	65
4.1.1.2 Connaître la distribution spatio-temporelle de la laminine $\gamma$ pour mieux comprendre son rôle dans la maintenance neuronale.....	67
4.1.1.3 Identifier les partenaires de <i>lam-2</i> dans la maintenance neuronale.....	69
4.1.1.4 La perte de maintenance pourrait entraîner un vieillissement prématuré .....	71
4.1.2 Le rôle de l'ADAMTS GON-1 dans la maintenance neuronale.....	72
4.1.2.1 Observer d'autres neurones et identifier la distribution spatio-temporelle de GON-1 .....	72
4.1.2.2 Connaître les interacteurs de GON-1 dans la maintenance neuronale .....	73
4.2 Trois gènes pourraient jouer un rôle dans la maintenance de l'organisation synaptique .....	75
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	77
BIBLIOGRAPHIE .....	79

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Anatomie du ver adulte <i>C. elegans</i> .....	5
1.2 Représentation de quelques-uns des tissus observables par des marqueurs fluorescents chez le ver <i>C. elegans</i> .....	7
1.3 Schéma du cycle de l'hermaphrodite <i>C. elegans</i> à 22°C. ....	10
1.4 Schématisation de la matrice extracellulaire .....	13
1.5 Représentation du système nerveux de <i>C. elegans</i> .....	16
1.6 Schéma simplifié représentant le développement du système nerveux et de la maintenance neuronale.....	18
1.7 Représentation des défauts de maintenance qui peuvent être observés .....	21
1.8 Schématisation des protéines impliquées dans la maintenance neuronale, axonale et synaptique.....	23
2.1 Schémas expérimentaux .....	34
2.2 Types de défauts observés pour les neurones ASH et ASI .....	37
2.3 Schéma de la zone de la corde dorsale sélectionnée pour faire les quantifications .....	38
2.4 Représentation de quelques cordes dorsales qui ont servi à sélectionner les paramètres de quantification.....	40
3.1 Représentation des deux types cribles génétiques possibles : le crible génétique classique et inverse.....	43
3.2 Schéma de l'ARNi par alimentation .....	45
3.3 Placement de quatre neurones chimiosensoriels permettant d'évaluer l'organisation des ganglions de la tête suivant les traitements d'ARNi .....	48
3.4 Pourcentage de vers présentant des défauts au premier et au deuxième jour de vie adulte.....	49
3.5 Gènes de la matrice extracellulaire dont la déplétion post-développementale	

par ARNi a montré un rôle dans la maintenance neuronale .....	51
3.6 Fluorescence observée sur la souche <i>lam-2(qy20) qyIs46</i> suite à la déplétion du gène <i>gon-1</i> .....	56
3.7 Expériences supplémentaires réalisées .....	56
3.8 Quantifications des synapses de la corde dorsale sur une section de 50 $\mu\text{m}$ .....	60
3.9 Quantifications du nombre de puncta et de la distance entre les puncta.....	62

## LISTE DES TABLEAUX

- 2.1 Liste des souches construites durant mes études au laboratoire Bénard ..... 27
- 2.2 Liste des clones bactériens utilisés pour faire l'ARNi ..... 28

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGNES ET DES ACRONYMES

ADAMTS	« <u>A</u> <u>D</u> isintegrin <u>A</u> nd <u>M</u> etalloproteinase with <u>T</u> hrombos <u>p</u> ondin Motifs »
ARN	<u>A</u> cide <u>r</u> ibonucléique
ARNdb	<u>A</u> RN <u>d</u> ouble <u>b</u> rin
ARNi	<u>A</u> RN <u>i</u> nterference
ARNm	<u>A</u> RN <u>m</u> essenger
ARNpi	petit <u>A</u> RN <u>i</u> ntéférent
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CRISPR	« <u>C</u> lustered <u>r</u> egularly <u>i</u> nterspaced <u>s</u> hort <u>p</u> alindromic <u>r</u> epeats »
<i>E. coli</i> OP50	<i>Escherichia coli</i> souche OP50
EtOH	Éthanol
EV	« <u>E</u> mpy <u>v</u> ector »
IPTG	iso-propyl-b-D-thiogalactopyranoside
J1	Premier jour de vie adulte
J2	Deuxième jour de vie adulte
J3	Troisième jour de vie adulte
L1	Premier stade larvaire
L2	Deuxième stade larvaire
L3	Troisième stade larvaire
L4	Quatrième stade larvaire
M9	<u>M</u> edium <u>9</u>
NGM	<u>N</u> ematode <u>G</u> rowth <u>M</u> edia
RISC	<u>R</u> NA- <u>i</u> nduced <u>s</u> ilencing <u>c</u> omplex
RPM	« <u>R</u> otation per <u>m</u> inute »

## LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

°C	Degré Celsius
cm	centimètre
$\mu\text{g}$	Microgramme
$\mu\text{L}$	Microlitre
mm	millimètre
mM	millimolaire
nm	Nanomètre
n.s.	non significatif
%	Pourcentage

## RÉSUMÉ

Lors de l'embryogenèse, le système nerveux est mis en place et s'en suit une période de maturation et de croissance où les neurones, déjà formés, grandissent et se complexifient, en plus, de l'ajout de nouveaux neurones. Cette maturation, ainsi que les mouvements corporels, entraînent des stress mécaniques pouvant perturber la structure du système nerveux. Cependant, des mécanismes de maintenance, tels que des protéines agissant à l'interface entre les neurones et la matrice extracellulaire (MEC) avoisinante, existent pour préserver activement son intégrité et sa fonctionnalité. Chez *C. elegans*, la protéine MIG-6/Papiline, découverte lors d'un crible des modificateurs des défauts de maintenance neuronale des mutants *sax-7/L1CAM*, a été identifiée comme étant impliquée dans la maintenance de l'organisation neuronale à long terme. Celle-ci modulerait la structure et la composition de la matrice extracellulaire afin de préserver l'architecture neuronale. En effet, chez les vers mutants dont la fonction de MIG-6/Papiline est affectée, d'autres composants de la matrice extracellulaire, tels que le collagène IV et la laminine, montrent une distribution anormale, indiquant l'importance de la matrice extracellulaire dans la maintenance neuronale. Avant ce travail, aucune étude systématique des rôles de la MEC dans la maintenance de l'architecture et des connectivités neuronales à long terme n'avait été effectuée dans aucun organisme. Parmi les 21 gènes testés lors de notre crible par ARN interférence (ARNi), trois nouveaux gènes ont été mis en évidence comme étant impliqués dans la maintenance à long terme des ganglions de la tête et trois gènes potentiellement impliqués dans la maintenance synaptique. Puisque la conservation des gènes entre l'humain et *C. elegans* est très importante, ce projet pose des bases qui pourraient aider au développement de stratégies de diagnostic, de prévention et de traitement de certaines conditions neurodégénératives actuellement non cataloguées.

Mots clés : maintenance neuronale, matrice extracellulaire, ARN interférence, *C. elegans*

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

Dans ce chapitre, le sujet de recherche de ce projet de maîtrise avec mémoire sera introduit par le biais d'une revue de la littérature afin de faire l'état des connaissances actuelles. Cette étude a pour objectif de mettre en évidence des facteurs impliqués dans la maintenance à long terme du système nerveux. En plus de l'introduction des connaissances de base nécessaires au projet, la problématique, les hypothèses, les objectifs et le plan de travail seront présentés.

### 1.1 Mise en contexte et problématique

La mise en place de l'architecture du système nerveux se déroule en grande partie lors de l'embryogenèse. Il s'en suit une période de maturation, où les neurones, déjà formés, grandissent en même temps que le reste du corps et se complexifient. En plus de cette maturation, de nouveaux neurones sont ajoutés aux circuits existants. Cette maturation, ainsi que les mouvements corporels et les accidents entraînent des stress mécaniques pouvant affecter le système nerveux en perturbant son organisation et sa connectivité. En réponse aux stress, l'organisme met en place des mécanismes dits de maintenance permettant de conserver activement l'intégrité des circuits neuronaux déjà établies, empêchant de ce fait une neurodégénérescence des structures acquises tel que mis en évidence par la recherche du laboratoire Bénard, et celle d'autres laboratoires (Bénard et Hobert, 2009).

Un exemple des conséquences d'une perte de la maintenance neuronale est la trisomie 21, où des structures dendritiques des neurones sont initialement bien établies chez l'enfant, mais dégénèrent par la suite (Bénard et Hobert, 2009). L'un de ces mécanismes met en jeu la matrice extracellulaire dans le but de conserver les structures neuronales en position. Ainsi, une dysfonction de la matrice extracellulaire pourrait causer de nombreux troubles. Par exemple, la matrice serait impliquée dans des maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer. En effet, l'élastine et les protéoglycanes à chaîne d'héparane sulfate induiraient une augmentation des peptides  $\beta$ -amyloïde, alors que d'autres protéines comme le collagène de type IV et la laminine permettraient à l'organisme de se débarrasser de ces peptides  $\beta$ -amyloïde, conférant une neuroprotection contre la maladie (Ma *et al.*, 2020). Bien que la matrice extracellulaire soit connue pour jouer un rôle dans les maladies neurodégénératives, peu d'informations sont disponibles sur son rôle dans la maintenance à long terme du système nerveux, c'est-à-dire après le développement complet de l'organisme. À ce jour, aucune étude systématique des rôles de la matrice extracellulaire dans la maintenance de l'architecture et des connectivités neuronales et synaptiques à long terme n'a été effectuée, et ce dans aucun organisme. Cela est dû à la complexité et à la variabilité retrouvées chez d'autres modèles d'études. Ce mémoire consiste donc à explorer la contribution de divers composants et régulateurs de la matrice extracellulaire à la maintenance de l'organisation neuronale et synaptique, dans le but de mieux comprendre le rôle de la matrice extracellulaire dans la maintenance de l'organisation neuronale à long terme.

## 1.2 But du projet de recherche

Les travaux présentés ici portent sur les bases moléculaires permettant au système nerveux de maintenir sa structure tout au long de la vie de l'organisme. Le ver *Caenorhabditis elegans* nous permet de combiner des approches de génétique, de

biologie moléculaire, ainsi que de microscopie à fluorescence afin de mener à bien notre projet.

Le point d'entrée de ce travail de maîtrise est la matrice extracellulaire que nous avons ciblée suite à la découverte de son implication dans la maintenance neuronale à long terme (Aurelio *et al.*, 2002; Bénard *et al.*, 2009; Bénard *et al.*, 2012; Bénard *et al.*, 2006; Desse *et al.*, 2021).

Au laboratoire, nous utilisons le ver *C. elegans* qui possède plusieurs ressemblances avec l'humain au niveau des mécanismes de développement, ainsi que des fonctions neuronales. De plus, ses 302 neurones et ses 56 cellules gliales ont été décrits et peuvent être étudiés *in vivo* (Hobert, 2010; Singhvi et Shaham, 2019; White *et al.*, 1986), avec une résolution d'une cellule à la fois, comme les neurones (Yemini *et al.*, 2021), faisant de lui un organisme idéal pour étudier la maintenance neuronale. À ce jour, nous savons que des protéines conservées agissent à l'interface entre les neurones et la matrice extracellulaire avoisinante pour maintenir l'organisation neuronale tout au long de la vie.

La matrice extracellulaire enveloppe les structures neuronales telles que les ganglions et les cordes nerveuses chez *C. elegans* (Huang *et al.*, 2003; Kramer, 2005). Par exemple, MIG-6/Papiline est une protéine de la matrice extracellulaire qui est impliquée dans la maintenance de l'organisation neuronale à long terme, tel que mis en évidence par d'autres membres du laboratoire (Nadour *et al.*; en préparation). Elle a récemment été découverte dans le laboratoire par un crible génétique classique qui avait pour but d'identifier des mutations modifiant les défauts de maintenance neuronale chez des mutants *sax-7/L1CAM* (Nadour *et al.*; en préparation). MIG-6/Papiline modulerait la structure de la matrice extracellulaire pour assurer un équilibre entre les forces d'adhésion et la flexibilité permettant ainsi de préserver l'architecture neuronale.

En effet, chez des mutants affectant la fonction de MIG-6/Papiline, des composants de la matrice extracellulaire, tels que le collagène de type IV et la laminine, montrent une distribution anormale, ce qui signale l'importance de la matrice extracellulaire dans la maintenance de l'architecture neuronale, surtout que les niveaux et la distribution du collagène de type IV sont requis pour la suppression des défauts de *sax-7* par la perte de fonction de *mig-6* (Nadour *et al.*; en préparation). En plus de MIG-6/Papiline, d'autres protéines, dont un grand nombre n'ont pas encore été identifiées, pourraient être impliquées dans la maintenance du système nerveux à long terme.

### 1.3 *C. elegans* un modèle de choix

#### 1.3.1 Bref historique de *C. elegans*

Dans le but de réaliser nos travaux de recherche en neurogénétique au sein du laboratoire, nous utilisons le modèle *C. elegans* (Figure 1.1). Ce nématode a été introduit en recherche par le biologiste Sydney Brenner en 1963. Il était à la recherche d'un modèle animal qui permettrait de faire des études génétiques en plus de pouvoir mettre en évidence la structure complète du système nerveux (Brenner, 1974). Son choix s'est ainsi arrêté sur la souche de type sauvage nommée N2 (Bristol), afin d'établir les bases de la génétique de cet organisme. Par l'utilisation d'un agent mutagène, le méthanesulfonate d'éthyle (EMS), Brenner a induit des mutations dans les vers *C. elegans* dans le but d'identifier des gènes permettant de contrôler la structure ou la fonction du système nerveux (Brenner, 1974). Depuis ces travaux novateurs avec *C. elegans*, de nombreux chercheurs ont utilisé et continuent d'utiliser ce modèle d'excellence. Dans la dernière décennie, plus de 16 000 articles publiés utilisaient le ver *C. elegans* et seulement en 2020, plus de 1 800 articles sont parus (Pubmed 5/08/2021).

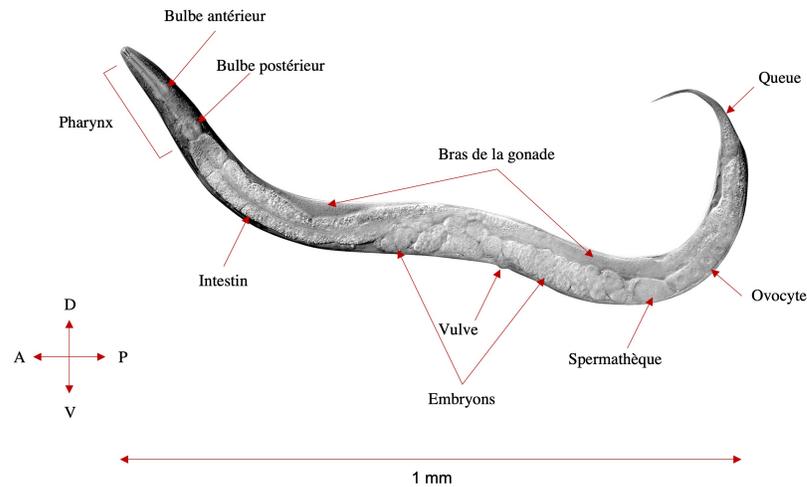


Figure 1.1 Anatomie du ver adulte *C. elegans*. Le ver est long d'environ 1mm lorsqu'il n'est pas courbé. Image de microscopie optique, prise avec un Nomarski DIC, d'un *C. elegans* hermaphrodite adulte. Image adaptée du Pr Sander van den Heuvel, biologie du développement, Université d'Utrecht, Pays-Bas.

La simplicité de ce modèle a permis, au cours des soixante dernières années, de nombreuses découvertes dans le domaine de la biologie moléculaire et cellulaire, dont trois ayant menées à des Prix Nobel. Le premier après que des chercheurs aient mis en évidence le phénomène de l'apoptose, ainsi que le mécanisme ou série de gènes permettant la mort cellulaire programmée (Ellis et Horvitz, 1986; Hedgecock *et al.*, 1983; Yuan *et al.*, 1993). Le deuxième Prix Nobel a été attribué suite à la découverte de la machinerie de l'ARN interférence (ARNi) permettant le silençage de gènes (Fire *et al.*, 1998). En plus d'avoir identifié le fonctionnement de l'ARNi, les Drs Fire et Mello ont développé une approche, portant le même nom que la machinerie, pouvant silencer de façon contrôlée les gènes d'intérêt (Fire *et al.*, 1998; Timmons *et al.*, 2001; Timmons et Fire, 1998). Finalement, la découverte, chez *C. elegans*, de la possibilité d'utiliser des protéines fluorescentes, telles que la GFP, pour marquer des cellules et des structures particulières (Figure 1.2) a été récompensée d'un Prix Nobel (Chalfie *et al.*, 1994). Depuis cette découverte, de nombreuses autres protéines sont employées pour marquer différentes structures et ainsi avoir la possibilité de les observer simultanément (Yemini *et al.*, 2021). Les travaux pionniers réalisés chez *C. elegans*

ont ouvert la porte à l'utilisation de protéines fluorescentes dans de multiples organismes et cellules (Chalfie, 2009).

Encore aujourd'hui, ce petit nématode est utilisé dans de nombreux contextes, et notamment dans le contexte des neurosciences où il a permis de mettre en évidence entre autres de nouvelles voies de signalisation (Shen *et al.*, 2001), en plus d'être utilisé comme modèle pour étudier des maladies génétiques humaines (Driscoll et Gerstbrein, 2003; Volovik *et al.*, 2014) ou encore pour accélérer la découverte de traitements pour des maladies orphelines (Patten *et al.*, 2017). Ces découvertes sont facilitées par une communauté scientifique très développée, collaborative et interconnectée, puisque de nombreux sites internet, tels que Wormbase, Wormatlas, Wormbook et Textpresso permettent d'accéder facilement à une multitude d'informations. Sans oublier les outils bio-informatiques, tels que GExplore, VisCello et CENGEN présentant des données sur l'expression des transcrits et/ou des protéines de *C. elegans* selon le type cellulaire et l'âge de l'animal (Cao *et al.*, 2017; Hammarlund *et al.*, 2018; Hutter et Suh, 2016).

### 1.3.2 Avantages de l'utilisation de *C. elegans*

Dès son entrée dans le monde de la recherche, dans les années 1960, *C. elegans* a été considéré comme un organisme très avantageux à utiliser. Ce nématode, non parasitaire et non pathogène pour l'humain, possède de nombreuses caractéristiques faisant de lui un modèle fantastique autant par son aspect physique que par sa biologie. Tout d'abord, il est transparent ce qui permet l'observation, *in vivo* et à faible coût, de nombreuses structures, telles que les intestins, le pharynx et la gonade au simple microscope optique (Figure 1.1 ; Riddle *et al.*, 1997) . Par ailleurs, avant l'utilisation de protéines fluorescentes, les mutations étaient identifiées uniquement sur l'aspect physique, d'où un nombre important de mutants *unc* pour « uncoordinated », c'est-à-dire non coordonnés, présentant donc des troubles de la locomotion (Brenner, 1974). Puis, par

microscopie à fluorescence, des protéines marquées à la GFP, par exemple, peuvent être observées *in vivo*. Il est ainsi possible d'observer, chez le ver vivant des structures telles que le système nerveux, les muscles et la lignée germinale (Figure 1.2), en plus de permettre l'étude du développement, de faire des cribles pour trouver des mutants qui affectent le développement et la fonction cellulaire et de caractériser des interactions protéiques (Boulin *et al.*, 2006; Chalfie *et al.*, 1994; Feinberg *et al.*, 2008). Sa transparence permet aussi d'observer *in vivo* le développement de l'embryon et des larves, ainsi que des protéines qui y sont impliquées, en plus de permettre d'observer la dynamique des protéines. De plus, la présence des marqueurs fluorescents *in vivo* rend plus facile la construction de souches par rapport à d'autres modèles comme la souris, puisque les structures peuvent être rapidement visualisées. Un autre avantage de ce nématode est sa petite taille, puisqu'il ne mesure que 1 mm de long ce qui nous offre la possibilité de cultiver facilement et rapidement un très grand nombre d'individus, sur des plaques de Pétri contenant un milieu NGM (Nematode Growth Media), et ce de façon continue (Cassada et Russell, 1975).

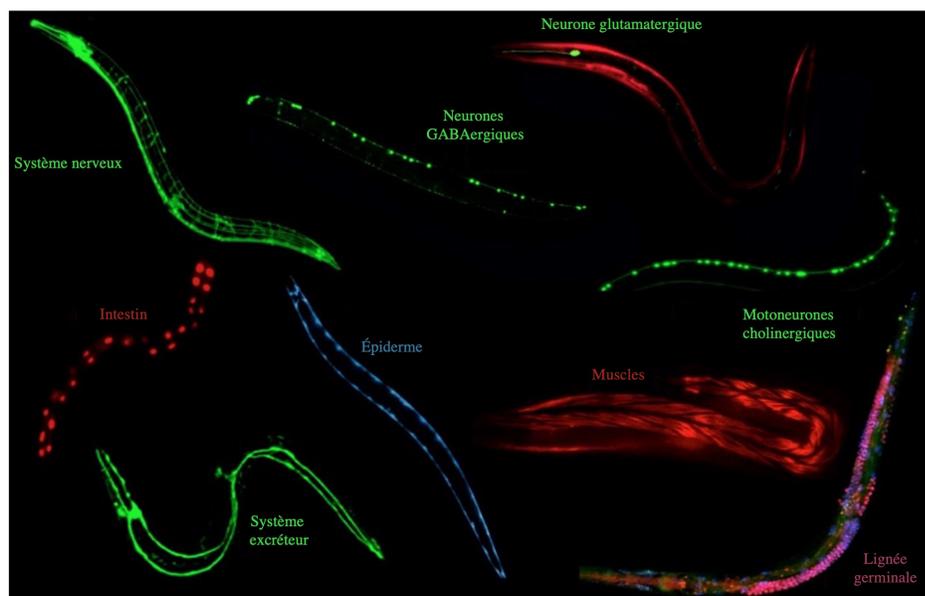


Figure 1.2 Représentation de quelques-uns des tissus observables par des marqueurs fluorescents chez le ver *C. elegans*. Pour chacun des vers représentés, un rapporteur fluorescent, sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique, a été utilisé. Ces rapporteurs sont intégrés dans le génome du vers et les structures marquées peuvent ainsi être observées *in vivo*. Image adaptée de Braden Katzman, 2017.

Un autre avantage est qu'il demande de très faibles coûts pour être cultivé. Il a besoin de sa nourriture, la bactérie *Escherichia coli*, et il nécessite d'être conservé dans des températures situées entre 15°C et 22°C, soit dans un incubateur, soit à température pièce, ce qui en fait un modèle simple à utiliser. De plus, il ne demande pas à être nourri quotidiennement, seulement une fois par semaine, en étant transféré dans une nouvelle boîte de Petriensemencée, afin de maintenir la souche. D'ailleurs, une conservation à 15°C permet de ralentir le développement des vers ce qui allonge la durée entre deux transferts de plaque, ainsi que de conserver les vers sur une période plus longue. *C. elegans* est aussi un des seuls organismes multicellulaires à résister à une longue cryoconservation, pouvant aller de quelques mois à plusieurs années à -80°C (Stiernagle, 2006). Cela nous permet donc de conserver de nombreuses souches sans avoir besoin de les nourrir continuellement, en plus de pouvoir décongeler la souche de nouveau si celle maintenue à 20°C est contaminée (par des mites, par exemple) ou si un trop grand nombre de mutations se sont accumulées dans le génome des vers. Cela donne l'avantage de ne pas avoir à construire la souche de nouveau.

Le cycle de vie de ce ver rond est très rapide. Son développement embryonnaire dure environ 16 heures (Corsi *et al.*, 2015), puis il atteint l'âge adulte en seulement trois jours, après être passé par quatre stades larvaires (Figure 1.3). De la première division cellulaire chez l'embryon à la fin de sa vie environ 20 jours seulement s'écoulent (Byerly *et al.*, 1976). Ce qui est rapide lorsque l'on compare avec d'autres organismes modèles tels que le rat qui a une durée de vie de 2 à 3 ans et dont la gestation dure entre 21 et 23 jours, soit la durée de vie de *C. elegans*, faisant de ce ver un modèle d'étude de choix. De plus, deux sexes existent chez *C. elegans* : l'hermaphrodite et le mâle.

La première a deux chromosomes sexuels, notés XX, et le second en a un seul, noté XO. La présence de l'hermaphrodite souligne un autre avantage important de ce nématode : l'hermaphrodite peut s'autoféconder, car elle possède à la fois une spermathèque contenant le sperme, ainsi qu'une gonade contenant les ovules. La présence de l'hermaphrodite au sein de cette espèce confère un très gros avantage, par rapport à d'autres espèces, comme le rat, la souris et la drosophile, pour qui seulement les femelles et les mâles existent. En effet, la capacité de l'hermaphrodite à s'autoféconder permet de maintenir une lignée de mutants sans avoir besoin d'opérer un accouplement : une seule hermaphrodite homozygote (P0) transfère de façon identique son code génétique à toute sa progéniture, qui est un clone parfait de l'hermaphrodite P0. Ainsi, toutes les générations futures devraient posséder un génome identique au ver P0, ce qui permet de maintenir une souche sans difficulté. Le mâle quant à lui n'est pas très fréquent dans la population endogène (0,1 % de la population) et en laboratoire, il est utilisé afin de transférer des nouvelles mutations par croisements (Brenner, 1974). De plus, la progéniture est aussi un facteur positif de l'utilisation de ce ver, puisqu'une seule hermaphrodite peut générer environ 300 individus par autofécondation, et lorsqu'une hermaphrodite est accouplée avec un mâle, le nombre d'individus peut grimper jusqu'à 1000 animaux. Avec une hermaphrodite, il est donc possible de maintenir une souche, mais aussi de créer des souches plus rapidement qu'avec d'autres modèles. La création d'une souche du premier croisement à l'obtention d'un mutant homozygote ne prend, normalement, que deux à trois mois.

Par ailleurs, depuis les années 1960, le lignage cellulaire du ver au complet, durant le développement embryonnaire et larvaire, a entièrement été décrit, puisqu'il est invariable au sein de l'espèce (Sulston *et al.*, 1983 ; Sulston et Horvitz, 1977). De plus, grâce à la microscopie électronique, son anatomie a été décrite en détail (Brenner, 1973; Byerly *et al.*, 1976; Lewis et Fleming, 1995; Wood, 1988), de même que le connectome du système nerveux, incluant toutes les synapses chimiques (White *et al.*,

1986). Finalement, c'est le premier métazoaire dont le génome a été entièrement séquencé et annoté (Consortium, 1998; Schwarz, 2005).

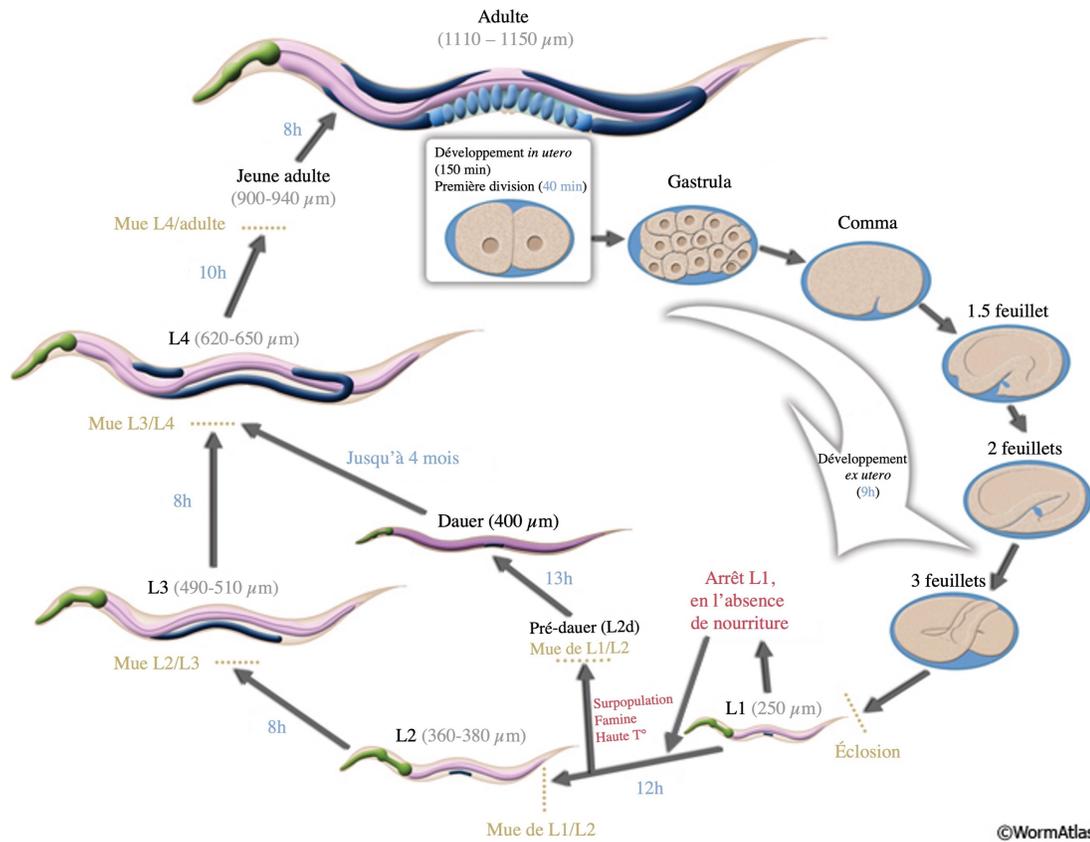


Figure 1.3 Schéma du cycle de l'hermaphrodite *C. elegans* à 22°C. Lorsque le spermatozoïde de l'hermaphrodite rencontre un de ses ovules, c'est le temps 0 de la fécondation. Le développement *in utero* est de 150 minutes et la première division se produit 40 minutes après la fécondation. Puis, le développement se poursuit *ex utero* pendant environ 9 heures, jusqu'à l'éclosion d'une larve au premier stade larvaire (L1). Pendant 12h, celle-ci se développe. Toutefois, en l'absence de nourriture, son développement s'arrête. En cas d'absence prolongée de nourriture, d'une surpopulation ou d'une température élevée, la larve entre dans un stade optionnel du développement appelé *dauer*, lui permettant de survivre jusqu'à 4 mois en attendant le retour de conditions optimales. Lorsque ces conditions optimales sont réunies, une première mue se produit suivant la croissance de la larve. La nouvelle larve du deuxième stade larvaire (L2) muera une seconde fois, après environ 8h de croissance pour atteindre le troisième stade larvaire (L3). La larve poursuit ensuite son développement vers le quatrième stade larvaire (L4) où une troisième mue est effectuée entre les stades L3 et L4. Finalement, après 10h au stade L4, une dernière mue se produit et l'hermaphrodite atteint le stade jeune adulte. À ce stade, l'hermaphrodite est complètement formée, mais elle n'est pas encore capable de

s'autoreproduire. C'est seulement après 8h qu'elle en est totalement capable. Lorsqu'elle atteint son premier jour de vie adulte, l'hermaphrodite mesure environ 1,1 mm de long. Image adaptée de WormAtlas.

Ainsi la connaissance de son lignage cellulaire, de son anatomie complète et de sa séquence génomique fait de lui un modèle d'excellence pour étudier la génétique, ainsi que les voies moléculaires. Un des multiples impacts du séquençage du génome entier fût la création d'une base de données impressionnante, à savoir la *C. elegans RNAi Library*, donnant accès à des clones bactériens qui permettent la déplétion des quelques 19 000 gènes du ver par ARN interférence (Kamath et Ahringer, 2003; Kamath *et al.*, 2003).

Pour conclure sur les avantages de *C. elegans*, il faut souligner que c'est un modèle de choix particulièrement pour étudier la neurogénétique étant donné les connaissances accumulées depuis des décennies avec l'aspiration de comprendre son système nerveux en entier. En effet, l'étude des neurones, en lien avec la matrice extracellulaire, s'y prête grandement étant donné le niveau de détail possible lors des analyses. Tous ces travaux sont d'autant plus pertinents, puisque la conservation des gènes entre l'humain et *C. elegans* est si importante qu'entre 60 et 80% des gènes humains ont un orthologue chez le ver (Kaletta et Hengartner, 2006) et qu'environ 70% des gènes liés à des maladies humaines ont des homologues chez le ver.

#### 1.4 La matrice extracellulaire chez le nématode *C. elegans*

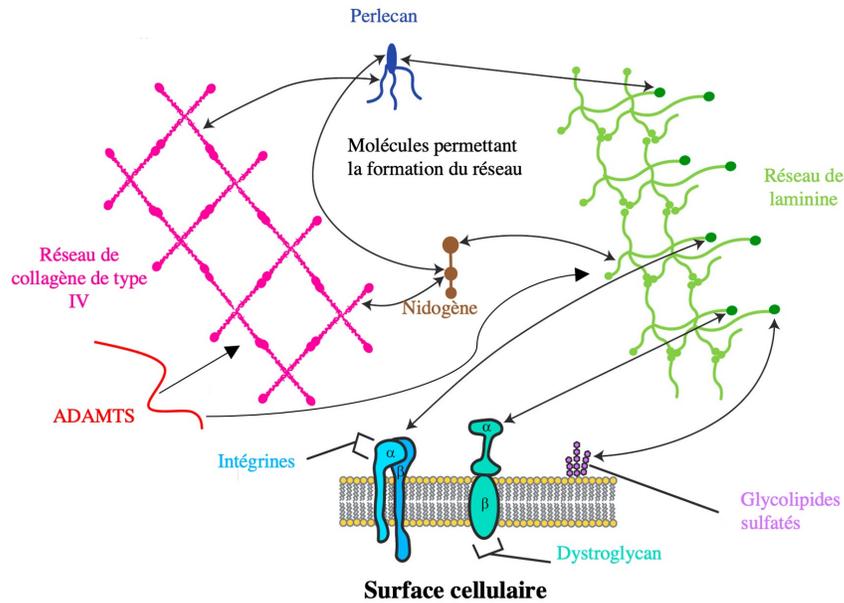
La matrice extracellulaire est une couche constituée d'un ensemble de protéines qui entoure les cellules (Figure 1.4A). Elle est essentielle pour la constitution des organismes multicellulaires et favorise la communication entre les cellules. Sa présence dès les premiers stades embryonnaires la rend essentielle à la formation de ces organismes pluricellulaires et permet de moduler les différents organes présents dans l'organisme. Son absence pouvant entraîner la mort embryonnaire (Gotenstein *et al.*,

2018; Gotenstein *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 1991). De plus, cette couche protéique joue un rôle essentiel lors de différents processus biologiques, et ce à tous les stades de vie des organismes. Elle favorise la migration et la prolifération cellulaire, en plus de maintenir l'intégrité des organes embryonnaire (Blelloch *et al.*, 1999; Drabikowski *et al.*, 2005). Rappelons que la prolifération des cellules, lors de la phase métastatique d'un cancer, est possible grâce aux mécanismes de prolifération cellulaire qui sont influencés par la matrice extracellulaire (Huang *et al.*, 2003; Jafari *et al.*, 2010; Jayadev et Sherwood, 2017; Mohamedi *et al.*, 2020).

La composition de la matrice extracellulaire varie selon le type de tissu; certaines protéines seront présentes en abondance dans un tissu alors qu'elles seront absentes d'un autre tissu (Figure 1.4B). Ces protéines peuvent être divisées en trois grandes catégories : les protéines structurales, les protéines régulatrices ou modulatrices et les protéines transmembranaires. La première catégorie comprend des protéines telles que le collagène de type IV, la laminine et perlecan, qui permettent de former la matrice extracellulaire et de lui donner sa structure. Elles sont produites majoritairement par les muscles de la paroi corporelle de *C. elegans*. Les protéines modulatrices, comme la MIG-6/Papiline et GON-1/ADAMTS, modifient la composition de la matrice extracellulaire (Hesselson *et al.*, 2004; Kawano *et al.*, 2009). Elles interfèrent avec les autres composantes de la matrice, mais aussi à d'autres niveaux, notamment au niveau des gènes, afin d'augmenter ou de diminuer la présence de certaines protéines. Une modification par les régulateurs de la matrice extracellulaire en module sa fonction. Finalement, les protéines transmembranaires effectuent le lien entre la matrice extracellulaire et les cellules. Ces protéines sont par exemple les intégrines, syndécan et dystroglycan. Ainsi, la variation en protéines dans la matrice extracellulaire permet de former des matrices spécialisées, telles que la membrane basale et les filets périneuronaux (Figure 1.4B; Huang *et al.*, 2003; Kramer, 2005; McRae et Porter, 2012). Celles-ci joueront ainsi des rôles différents selon le tissu où elles sont localisées

et des mutations dans les gènes codant pour ces protéines pourraient avoir de graves conséquences (Bonnans *et al.*, 2014; Jayadev et Sherwood, 2017; Theocharis *et al.*, 2019).

A



B

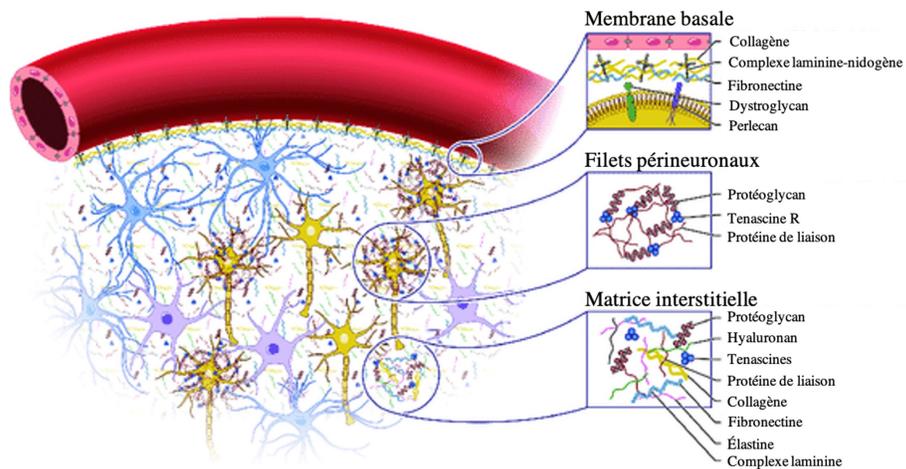


Figure courtesy of Cleveland FES Center

Figure 1.4 Schématisation de la matrice extracellulaire. Au-dessus de la bicouche lipidique de la cellule se situe la matrice extracellulaire. Certaines de ses protéines sont structurales, telles que le collagène, la laminine, le nidogène et perlecan, qui constituent le squelette de la matrice

extracellulaire. Des protéines modulatrices, telles que la MIG-6/Papiline et GON-1/ADAMTS, modifient la composition de la matrice extracellulaire. Puis des récepteurs transmembranaires tels que les intégrines et le dystroglycan interagissent avec la matrice extracellulaire créant des liens moléculaires entre les cellules et la matrice. Représentation simplifiée des liens entre les différentes protéines de la matrice extracellulaire (A). La matrice extracellulaire peut être composée de différentes protéines induisant sa spécification (B). Images adaptées de (Jayadev et Sherwood, 2017; Ma *et al.*, 2020)

Les protéines de la matrice extracellulaire étant essentielles au bon développement des organismes multicellulaires, une mutation dans un gène de la matrice extracellulaire qui résulte en un changement de conformation de la protéine pourrait causer des troubles lors de l'organogénèse, par exemple. Ainsi, une délétion dans la sous-unité EMB-9 du collagène de type IV entraîne un arrêt du développement de l'embryon, et ce de façon systématique, conduisant à la mort embryonnaire. De même que pour une mutation dans une des quatre sous-unités de la laminine, deuxième composant le plus important dans la matrice extracellulaire après le collagène. En effet, la laminine jouerait un rôle dans la polarisation cellulaire, dans l'organisation de la matrice extracellulaire, ainsi que des récepteurs et dans la formation des tissus lors de l'embryogenèse. Dès lors, une mutation dans une des sous-unités entraîne un arrêt de l'embryogenèse et donc la mort embryonnaire (Hohenester et Yurchenco, 2013; Huang *et al.*, 2003; Kao *et al.*, 2006; Morrissey et Sherwood, 2015).

De récentes études ont révélé que la maintenance de l'intégrité de la matrice extracellulaire est essentielle pour maintenir les fonctions des différents organes (Aurelio *et al.*, 2002; Bénard *et al.*, 2009; Bénard *et al.*, 2012; Bénard *et al.*, 2006; Desse *et al.*, 2021). Un dysfonctionnement de certaines protéines de la matrice extracellulaire au cours de la vie d'un organisme pourrait donc causer de nombreux troubles.

## 1.5 Le système nerveux chez *C. elegans*

### 1.5.1 Les neurones

Chez *C. elegans*, la formation du système nerveux est effectuée en grande majorité (environ 75%) lors du développement embryonnaire et se poursuit durant le premier stade larvaire (Hobert, 2010). L'hermaphrodite possède un nombre invariable de 302 neurones, alors que l'humain, à la naissance, en possède plus de 100 milliards et cela augmente avec l'âge et varie d'un individu à l'autre (Bénard et Hobert, 2009). Faisant ainsi de *C. elegans* un modèle d'étude plus simple pour étudier le système nerveux. Ces 302 neurones sont classés en 118 classes constituées de 1 à 13 neurones (Figure 1.5C). Ceux-ci sont classés selon différents critères tels que la morphologie, la connectivité et la position des neurones (White *et al.*, 1986). Les neurones sont répartis dans tout le ver et ont des fonctions bien différentes. Toutefois, c'est au niveau de la tête du ver que se concentre la majorité des axones des neurones (Figure 1.5). Ces axones forment un anneau nerveux appelé « nerve ring » ou neuropile qui est considéré comme le centre intégratif du ver, souvent appelé son « cerveau ». Postérieurement au neuropile se trouvent les soma des neurones le constituant (Figure 1.5A). Ces ensembles de soma sont appelés les ganglions de la tête. Puis le neurite de la majorité de ces soma passe par le neuropile d'une part, et projettent également soit dans la corde ventrale, soit dans la corde dorsale du ver (Figure 1.5B).

### 1.5.2 Les synapses

Tout au long du neuropile, de la corde ventrale et de la corde dorsale du ver, des synapses de types en passant (White *et al.*, 1986), sont présentes le long de l'axone, et permettent une communication de l'information. Ces synapses communiquent soit avec les axones à proximité soit avec les bras musculaires (Jin, 2005; White *et al.*, 1986). Cette connectivité neuronale se fait grâce aux 7000 synapses, jonctions neuromusculaires et jonctions communicantes présentes chez le ver et pour lesquelles

de nombreux neurotransmetteurs sont identiques à ceux trouvés chez l'humain, tels que le GABA, l'acétylcholine et le glutamate. Contrairement à des organismes plus élaborés comme l'humain, les densités présynaptiques chez *C. elegans* sont beaucoup moins complexes, rendant plus facile leur étude (Jin, 2005; White *et al.*, 1986).

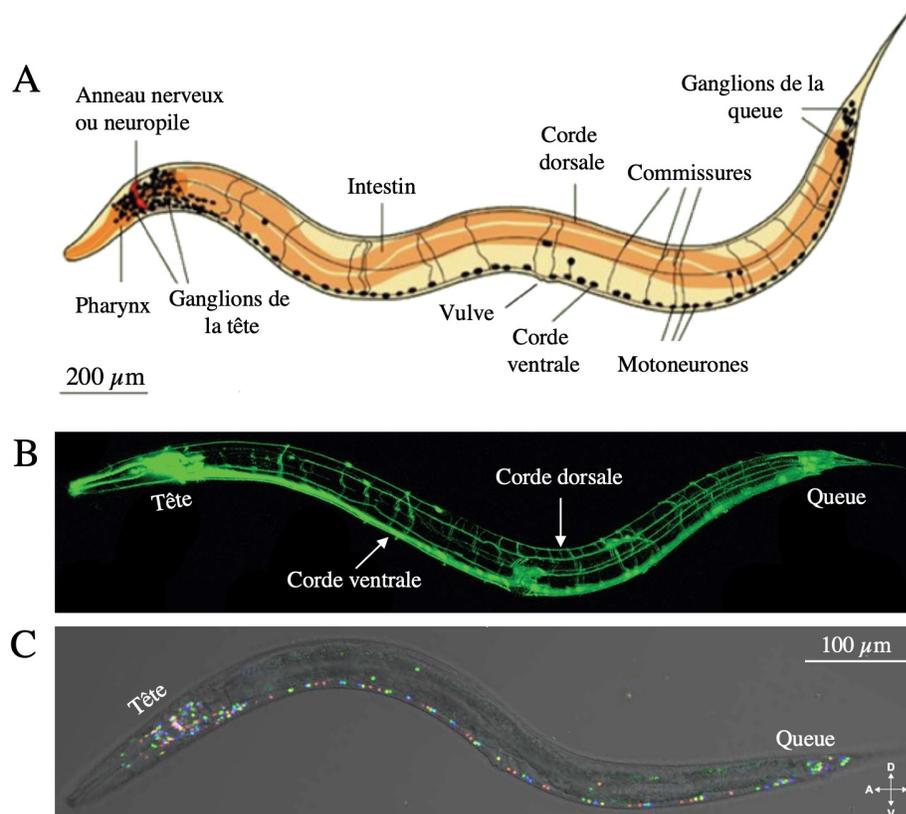


Figure 1.5 Représentation du système nerveux de *C. elegans*. Le système nerveux du ver est distribué tout au long de son corps, notamment dans les ganglions de la tête, de la queue et le long de la corde ventrale. Toutefois, la majeure partie des neurones se situent au niveau des ganglions de la tête. Schéma du système nerveux de l'hermaphrodite (A). Image de microscopie à fluorescence d'une hermaphrodite adulte disposée sur le côté. Le système nerveux est ici visualisé grâce à l'utilisation d'un marqueur pan-neuronale exprimant la GFP (le transgène est *rgef-1p::GFP*) (B). L'utilisation du marqueur fluorescent NeuroPal permet d'identifier les noyaux des 302 neurones de l'hermaphrodite. Chacune des 118 classes de neurones est marquée avec une fluorescence différente (C). Images adaptées de (Emmons, 2015; Gally et Bessereau, 2003; Yemini *et al.*, 2021)

## 1.6 La maintenance de l'organisation du système nerveux

### 1.6.1 Qu'est-ce que la maintenance neuronale ?

Après avoir complété sa formation, de nombreux facteurs mettent à l'épreuve le système nerveux qui doit s'adapter, tout au long de la vie post-natale de l'organisme, à (i) la croissance de l'organisme et (ii) à la maturation du système nerveux, comme l'ajout post-développemental de neurones. En effet, à l'âge adulte, de nouvelles connexions se forment permettant une plasticité cérébrale (Bénard et Hobert, 2009). Ces connexions doivent donc avoir la possibilité de s'établir sans mettre en péril la structure déjà mise en place. De plus, d'autres mouvements cellulaires ont lieu et ne doivent pas perturber le système nerveux. Puis, le système nerveux doit s'adapter (iii) aux stress mécaniques induits par les différents mouvements corporels, tels que le pompage chez le ver et l'alimentation chez l'humain; en plus de faire face (iv) au vieillissement et (v) aux accidents. Ainsi, la maintenance neuronale se caractérise par tous les mécanismes qui permettent de protéger le système nerveux malgré les forces physiques, autant internes qu'externes, qui lui sont imposées (Bénard et Hobert, 2009). La maintenance neuronale passe donc par le maintien de la survie des neurones (soma, dendrites, axone et synapses), le maintien de leur identité, ce qui est assuré par l'expression d'un ensemble de gènes particuliers, ainsi que par le maintien de l'organisation neuronale (Bénard et Hobert, 2009). Tout comme l'humain, *C. elegans* fait face à ces épreuves faisant ainsi de lui un merveilleux modèle pour étudier les mécanismes de la maintenance neuronale (Figure 1.6).

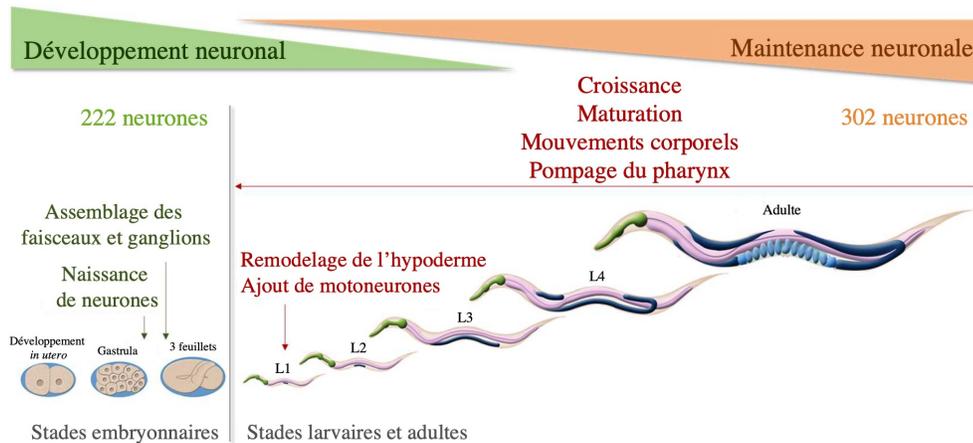


Figure 1.6 Schéma simplifié représentant le développement du système nerveux et de la maintenance neuronale. Lors de l'embryogenèse, la majorité des neurones sont formés. Les neurones naissent peu après le stade de la gastrula et peu avant le stade embryonnaire du 3-fold, les faisceaux neuronaux et les ganglions sont assemblés. Ainsi, juste après l'éclosion de la larve du premier stade larvaire (L1), celle-ci possède 222 neurones. Suite à l'éclosion, un remodelage de l'épiderme est effectué chez la larve du premier stade larvaire (L1) en plus de l'ajout de motoneurones. Dès l'éclosion de nombreuses épreuves, telles que la croissance du ver, la maturation de son système nerveux, ses mouvements corporels (par exemple le pompage de la nourriture par le pharynx) et son vieillissement ont un impact sur son système nerveux. D'où l'importance de connaître des facteurs de maintenance permettant de contrecarrer les effets de ces épreuves. Image adaptée de Virginie Desse, Laboratoire Bénard.

De récentes études ont mis en évidence des mécanismes qui permettent de maintenir activement l'architecture et la connectivité neuronale sur le long terme, c'est-à-dire du moment où la structure neuronale aura complété son développement (Figure 1.7; Aurelio *et al.*, 2002; Bénard et Hobert, 2009; Bénard *et al.*, 2009; Bénard *et al.*, 2012; Bénard *et al.*, 2006; Desse *et al.*, 2021; Sasakura *et al.*, 2005). Ces mécanismes de maintenance sont rendus possibles par l'action de protéines, elles-mêmes codées par des gènes appelés « gènes de maintenance de l'architecture neuronale » permettant la maintenance neuronale et synaptique (Bénard et Hobert, 2009).

### 1.6.2 Les facteurs de la maintenance neuronale

### 1.6.2.1 Les facteurs permettant la maintenance des fascicules axonaux et des ganglions de la tête

Des molécules d'adhésion provenant de la famille des immunoglobulines (Ig) ont été mises en évidence comme participant activement à la maintenance de l'architecture du système nerveux. L'une des premières protéines à avoir été identifiée comme jouant un rôle dans la maintenance neuronale est une protéine extracellulaire appelée DIG-1. Cette imposante protéine est composée de 13 100 acides aminés et elle contient plusieurs domaines tels que les domaines immunoglobulines (Ig), les domaines fibronectine de type III (FnIII), le domaine sushi, les facteurs de croissance épidermale (EGF) et le facteur von Willebrand (vWA) qui sont tous impliqués dans l'interaction entre les cellules et l'adhésion cellulaire (Figure 1.8D). De plus, cette protéine est la plus grosse protéine sécrétée connue à ce jour. Pour maintenir les neurones en place, DIG-1 n'a pas besoin d'être exprimée au niveau des neurones maintenus, mais elle doit être présente dans les muscles afin que sa sécrétion permette la maintenance du système nerveux. Ainsi, sa présence après le développement du système nerveux permet de maintenir les axones et les corps cellulaires (soma) respectivement dans les fascicules axonaux et les ganglions (Figure 1.7). Il a donc été montré que *dig-1* permet la maintenance des axones droit et gauche du neurone PVQ dans les fascicules, en plus de maintenir dans les ganglions de la tête les soma des neurones ASH et ASI (Bénard *et al.*, 2006).

Un autre exemple est celui des protéines ZIG-3 et ZIG-4 (Figure 1.8B). Celles-ci sont composées de deux domaines immunoglobuline (Ig) et elles sont sécrétées par l'interneurone PVT. Elles agissent au niveau post-développemental dans le but de maintenir les axones des neurones PVQ et PVP dans la corde nerveuse ventrale (Aurelio *et al.*, 2002; Bénard *et al.*, 2009).

De plus, l'isoforme EGL-15(5A), dont l'orthologue chez l'humain est le récepteur des facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR), joue, lui aussi, un rôle dans la maintenance axonale (Figure 1.8C). Cette protéine de la famille des immunoglobulines, contient trois domaines immunoglobuline (Ig) et un domaine tyrosine kinase, agit de façon post-développementale afin de maintenir les axones des neurones PVQ et PVP dans leur fascicule axonal (Bülow *et al.*, 2004). À noter que ce n'est que le domaine extracellulaire qui est requis pour sa fonction dans la maintenance neuronale, car le domaine kinase intracellulaire peut-être retiré par recombinaison moléculaire et la protéine recombinante fonctionne toujours dans le cadre de la maintenance (Bülow *et al.*, 2004).

Une protéine, intensivement étudiée au laboratoire, a été mise en évidence comme jouant un rôle important dans la maintenance neuronale. Cette protéine de la superfamille des immunoglobulines, appelée SAX-7, est l'orthologue de la protéine humaine LICAM qui est impliquée dans l'adhésion des neurones (Figure 1.8A). Elle a été identifiée lors d'un crible génétique où des défauts de maintenance du neuropile ont été identifiés (Zallen *et al.*, 1999). La protéine SAX-7 est composée de domaines immunoglobulines (Ig) et de domaines fibronectine de type III et elle est présente soit sous la forme longue, soit sous la forme courte. Chez *C. elegans*, de nombreuses études ont mis en évidence l'action post-développementale de cette protéine dans la maintenance neuronale, notamment au niveau des fascicules de la corde ventrale ainsi que des ganglions de la tête (Desse *et al.*, 2021; Pocock *et al.*, 2008; Ramirez-Suarez *et al.*, 2019; Sasakura *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). De plus, une étude menée dans notre laboratoire a montré que seule la forme courte, SAX-7S, était impliquée dans la maintenance des neurones ASH et ASI dans les ganglions de la tête (Desse *et al.*, 2021), confirmant des observations antérieures indiquant que l'isoforme SAX-7S était importante (Pocock *et al.*, 2008; Sasakura *et al.*, 2005).

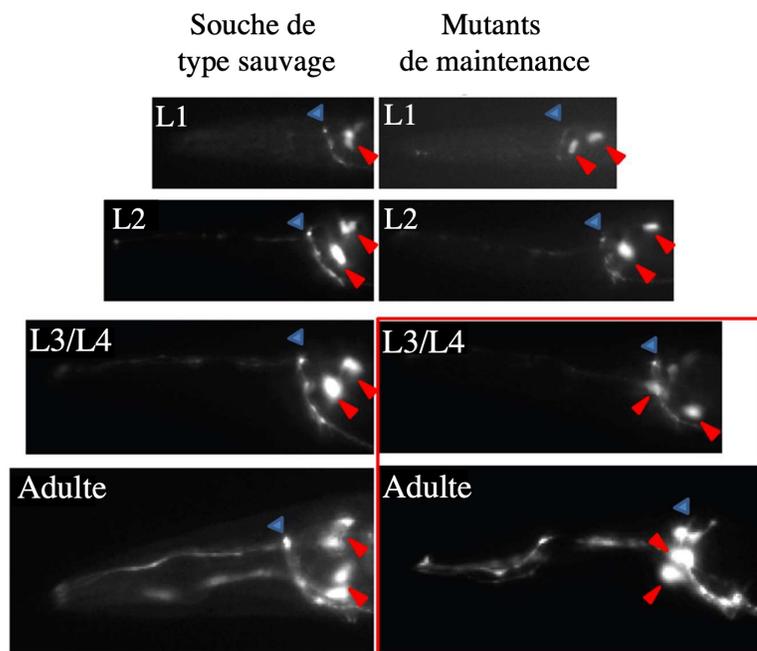


Figure 1.7 Représentation des défauts de maintenance qui peuvent être observés. Chez la souche de type sauvage, les somas des neurones, indiqués par les flèches rouges, sont situés postérieurement au neuropile, indiqué par la flèche bleue, et ce pour tous les stades larvaires (L1 à L4) ainsi qu'à l'âge adulte. En ce qui concerne les mutants de maintenance, ils ne présentent aucun défaut aux deux premiers stades larvaires (L1 et L2). Alors qu'après le développement complet de ces neurones, un déplacement des soma est observé à partir du troisième stade larvaire (L3 jusqu'à l'âge adulte) et ces défauts empirent dans le temps. Les mutants de maintenance sont appelés ainsi en raison du fait que les neurones se sont bien développés et que l'organisme a échoué à les maintenir dans leur position ultérieurement. Image adaptée de (Bénard *et al.*, 2012).

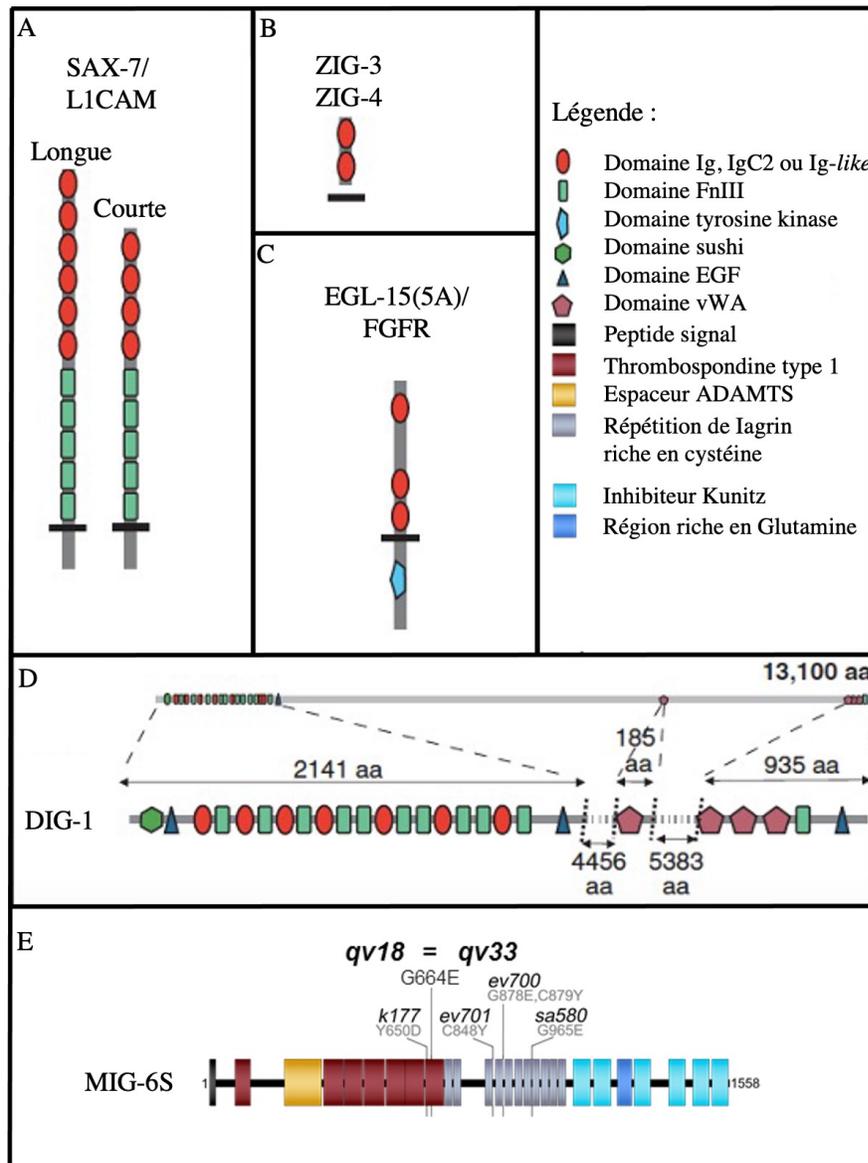
Enfin, lors d'un criblage génétique classique, effectué dans notre laboratoire, d'autres gènes ont été identifiés comme jouant un rôle dans la maintenance neuronale. Ce criblage avait pour but de mettre en évidence des suppresseurs des défauts de maintenance des mutants *sax-7*. Une de ces protéines est MIG-6, dont l'orthologue chez l'humain est la papiline (Figure 1.8E). Cette protéine est, entre autres, composée de domaines thrombospondine de type 1 et d'un espaceur ADAMTS qui forment la cassette de papiline. La protéine MIG-6/Papiline est présente sous deux isoformes : la forme courte et la forme longue, qui possède deux domaines supplémentaires. Nadour *et al.* (en préparation) ont montré que la forme courte de MIG-6/Papiline était

l'isoforme impliquée dans la modification des défauts de maintenance des mutants *sax-7* et que pour cela MIG-6/Papiline doit être sécrétée à partir des muscles. Par ailleurs, la suppression des défauts de *sax-7* par MIG-6/Papiline est faite de façon dépendante de l'expression d'une autre protéine MIG-17/ADAMTS. Ainsi, MIG-6/Papiline et MIG-17/ADAMTS agirait dans la même voie de signalisation afin de maintenir, de façon post-développementale, les structures neuronales (Nadour *et al.*; en préparation). En effet, la localisation de MIG-17 est affectée dans des mutants *mig-6* (Kawano *et al.*, 2009). Ces deux protéines jouent aussi un rôle important dans la modulation de la matrice extracellulaire, puisque les mutants *mig-6* et *mig-17* montrent une densification du collagène de type IV, ainsi qu'une modulation de la laminine  $\beta$  (Nadour *et al.*; en préparation).

#### 1.6.2.2 Les facteurs permettant la maintenance des structures synaptiques

Au cours des dernières années, quelques protéines ont été mises en évidence comme jouant un rôle dans la maintenance synaptique. La protéine ZIG-10 de la superfamille des immunoglobulines jouerait un rôle dans la maintenance synaptique. Son expression à la fois à partir de l'épiderme et des neurones serait à l'origine de la maintenance des densités synaptique des neurones cholinergiques (Cherra et Jin, 2016; Howell et Hobert, 2016). Une ADAMTS, la protéine GON-1, serait, elle aussi, impliquée dans la maintenance de la morphologie des synapses au niveau des jonctions neuromusculaires. Lorsque GON-1/ADAMTS dégrade EMB-9/collagène de type IV, cela permettrait de stabiliser la protéine FBL-1/Fibuline permettant ainsi de maintenir la morphologie des synapses (Kurshan *et al.*, 2014). Une autre étude a soulevé le rôle potentiel d'une autre molécule d'adhésion, la neurexine, dans la maintenance des épines dendritiques, qui sont des structures présynaptiques (Philbrook *et al.*, 2018). Toutefois, les études menées sur la maintenance post-développementale des synapses

sont beaucoup moins nombreuses que les études menées sur la maintenance neuronale et nécessitent des études plus poussées.



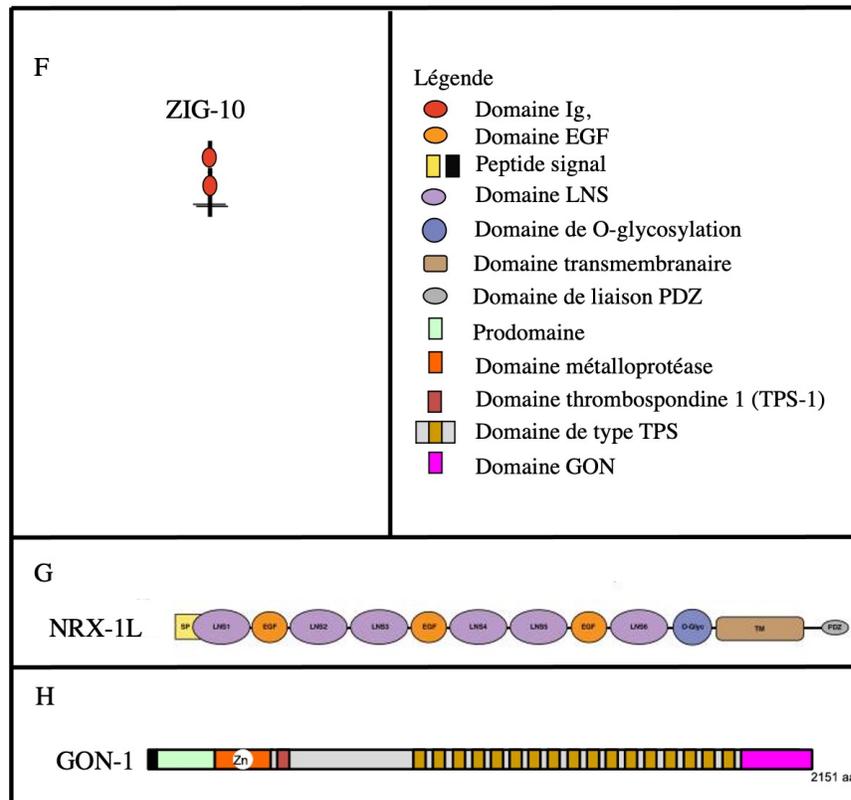


Figure 1.8 Schématisation des protéines impliquées dans la maintenance neuronale, axonale et synaptique. Au cours des dernières années, de nombreuses molécules ont été mises en évidence comme permettant la maintenance à long terme du système nerveux. Certaines de ses molécules jouent un rôle au niveau des ganglions de la tête et des axones telles que les protéines de la superfamille des immunoglobulines (A à D) et la protéine MIG-6S/Papiline (E), alors que d'autres, comme la protéine de la famille des immunoglobulines ZIG-10, la NRX-1L/neurexine et GON-1/ADAMTS, agiraient au niveau de la maintenance synaptique (F à H). Schéma adapté de Bénard et Hobert, 2009; Howell et Hobert, 2016; Kim et Nishiwaki, 2015; Nadour *et al.* en préparation; Philbrook *et al.*, 2018.

### 1.7 Objectifs de recherche

*C. elegans* a été choisi comme organisme modèle par Brenner avec l'objectif de comprendre entièrement le développement de la structure du système nerveux et son fonctionnement, via l'étude des gènes impliqués. Le travail présenté ici s'insère ainsi dans le prolongement de sa compréhension. De plus, des travaux réalisés au laboratoire ont démontré l'importance des gènes codant pour des protéines de la matrice

extracellulaire, telles que *mig-6* et *mig-17* dans la maintenance de l'architecture du système nerveux. Par le biais d'un crible génétique, effectué avec l'approche de l'ARN interférence (ARNi), nous avons cherché à mieux comprendre le rôle de la matrice extracellulaire dans le maintien de l'organisation du système nerveux permettant ainsi de contribuer à l'avancement des connaissances sur le maintien à long terme du système nerveux.

Dans ce mémoire, nous répondrons aux objectifs du plan de travail qui suit :

1.7.1 Analyse systématique de gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire pour tester leur implication dans la maintenance de l'organisation neuronale

Des gènes de la matrice extracellulaire ont préalablement été identifiés lors d'un crible génétique classique au laboratoire, ainsi que par l'étude de gènes reliés, comme permettant la maintenance de l'organisation neuronale. Nous émettons donc l'hypothèse que d'autres gènes de la matrice extracellulaire sont impliqués dans la protection de l'organisation du système nerveux à long terme.

1.7.2 Analyse systématique de gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire pour tester leur implication dans la maintenance de l'architecture des structures présynaptiques de motoneurones

Considérant que des protéines de la matrice extracellulaire sont impliquées dans la formation des synapses (Jin, 2005; Qin *et al.*, 2014), et que certaines protéines assurant le développement peuvent aussi se révéler être importantes pour la maintenance, nous émettons l'hypothèse que des gènes sont activement impliqués dans la maintenance à long terme des structures présynaptiques des neurones.

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Souches de nématodes et génétique

Les cultures de nématodes ont été maintenues dans un incubateur à 20°C dans des plaques de Pétri avec un milieu NGM (*Nematode Growth Medium*), tel que décrit (Brenner, 1974). Les vers ont été cultivés sur des plaquesensemencées avec 50  $\mu$ L de la souche OP50 d'*Escherichia coli* (Hartman et Herman, 1982), sauf indication contraire. Des souches de nématodes ont été nouvellement construites suivant les procédures génétiques standards et les génotypes ont été confirmés par microscopie à fluorescence ou par un génotypage PCR, lorsque nécessaire. Toutes les souches mutantes ont été croisées au moins trois fois avec la souche sauvage N2 (Bristol) avant d'être utilisées pour les observations. Toutes les souches construites lors de mes études sont listées à la Table 2.1.

Souches	Génotype	Transgène
VQ1702	<i>hdlIs26 III ; juIs1 V</i>	<i>odr-2p::CFP , sra-6p::DsRed2</i> <i>unc-25p::snb-1::GFP + lin-15(+)</i>
VQ1766	<i>lam-2(qy20[lam-2::mNG +LoxP]) qyIs46 X</i>	<i>lam-2(qy20[lam-2::mNG+LoxP])</i> <i>emb-9::mCherry</i>
VQ1563	<i>mig-17(k174)/dpy-11(e224)oyIs14 V ; qyIs46 X</i>	<i>emb-9::mCherry</i>
VQ1592	<i>hdlIs26 III; evIs111 V</i>	<i>odr-2p::CFP , sra-6p::DsRed2</i> <i>F25B3.3::GFP + dpy-20(+)</i>
VQ1616	<i>sax-7(qv30) IV; mig-17(k174) V; hdlIs26 III; qyIs7 X</i>	<i>odr-2p::CFP , sra-6p::DsRed2</i> <i>lam-1::gfp</i>
VQ1617	<i>sax-7(qv30) IV; mig-17(k174) V; qyIs7 X</i>	<i>lam-1::gfp</i>
VQ1621	<i>evIs213 ; qyIs7</i>	<i>mig-17p::GFP , unc-119p(+)</i> <i>lam-1::gfp</i>
VQ1622	<i>pxn-2(ju358) X; hdlIs26 III</i>	<i>odr-2p::CFP , sra-6p::DsRed2</i>
VQ1623	<i>mig-6(qv33) mig-17(k174) V ; qyIs7 X</i>	<i>lam-1::gfp</i>
VQ1644	<i>mig-6(qv33) V; pxn-2(ju358) X; hdlIs26 III</i>	<i>odr-2p::CFP , sra-6p::DsRed2</i>
VQ1700	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; qyIs46 X; qvEx396</i>	<i>emb-9::mCherry</i>
VQ1701	<i>mig-6(qv33) V; qyIs46 X; qvEx396</i>	<i>emb-9::mCherry</i>
VQ1708	<i>mig-6(qv33) V; juIs1 IV</i>	<i>unc-25p::snb-1::GFP + lin-15(+)</i>
VQ1742	<i>qvIs9</i>	<i>mig-6p::mNeonGreen:mig-6s</i>
VQ1752	<i>hdlIs26 III; lam-2(qy20[lam-2::mNG +LoxP]) X</i>	<i>odr-2p::CFP , sra-6p::DsRed2</i>
VQ1814	<i>sax-7(qv30) IV; lam-2(qy20[lam-2::mNG +LoxP]) qyIs46 X</i>	<i>lam-2(qy20[lam-2::mNG+LoxP])</i> <i>emb-9::mCherry</i>
VQ1826	<i>mig-6(qv33) V; lam-2(qy20[lam-2::mNG +LoxP]) qyIs46 X</i>	<i>lam-2(qy20[lam-2::mNG+LoxP])</i> <i>emb-9::mCherry</i>

Table 2.1 Liste des souches construites durant mes études au laboratoire Bénard. Les deux premières souches de la liste, VQ1702 et VQ1766, ont été utilisées dans le cadre de cette étude. Les autres ont été ou seront utilisées dans le cadre de prochaines études.

## 2.2 Préparation préalable pour les expériences d'ARN interférence

Pour les expériences d'ARN interférence (ARNi), les vers ont été transférés sur des plaquesensemencées avec des clones bactériens, listés à la Table 2.2, dans la souche bactérienne HT115(DE3).

Transcrit	Gène	Bactérie	Référence
L4440		HT115(DE3)	(Timmons and Fire, 1998 ; Timmons <i>et al.</i> 2001)
F41G3.12	<i>agr-1</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
K07C11.5	<i>cri-2</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
T21B6.1	<i>dgn-1</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
K08C7.3	<i>epi-1</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
F56H11.1	<i>fbl-1</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
ZK783.1	<i>fbn-1</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
F25H8.3	<i>gon-1</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
F59D12.4	<i>gpn-1</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
F15G9.4	<i>him-4</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
F54G8.3	<i>ina-1</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
W03F8.5	<i>lam-1</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
C54D1.5	<i>lam-2</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
C37C3.6	<i>mig-6</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
F57B7.4	<i>mig-17</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
F54F3.1	<i>nid-1</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
F54F2.1	<i>pat-2</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
K09C8.5	<i>pxn-2</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
F57C7.3	<i>sdn-1</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
F10E7.4	<i>spon-1</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
K07C11.3	<i>timp-1</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)
ZC101.2	<i>unc-52</i>	HT115(DE3)	Kamath RS et Ahringer J (2003)

Table 2.2 Liste des clones bactériens utilisés pour faire l'ARNi.

### 2.2.1 Préparation des cultures bactériennes et extraction d'ADN

Des clones de bactérie contenant chacun une séquence nécessaire pour produire l'ARNi d'un gène de *C. elegans* donné, provenant de la librairie Ahringer (Kamath *et al.*, 2003), ont été utilisés pour ce projet. Lors des clonages et réplifications de la librairie, des

erreurs peuvent avoir lieu (Qu *et al.*, 2011). Dans le but de confirmer l'identité du gène d'intérêt cloné dans le plasmide du clone bactérien avant de les utiliser en ARNi, des cultures bactériennes ont été préparées pour en extraire l'ADN plasmidique et le séquencer. Une colonie isolée a été prélevée pour chaque clone et elle a été incubée dans 1 mL de LB, supplémenté de 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'ampicilline et de 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tétracycline, pendant 18h à 37°C avec une agitation de 200 rpm. De cette préculture, 30  $\mu\text{L}$  de bactéries ont été suspendus dans 3 mL de LB avec 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'ampicilline, puis les bactéries ont été cultivées pendant 18h dans les mêmes conditions que la préculture.

Pour extraire les plasmides, les bactéries sont d'abord culottées dans des Eppendorf de 1,5 mL en les centrifugeant à 12 000 rpm pendant 2 minutes, avec une centrifugeuse « Centrifuge 5424 » de la marque Eppendorf. Le surnageant a ensuite été retiré. Cette étape pour culotter les clones a été faite 2 fois pour récupérer toutes les bactéries. Le kit « Plasmid DNA Miniprep Kit » de BioBasic a été utilisé et le protocole inclus a été suivi. Après l'extraction de l'ADN, la quantité d'ADN bactérien en  $\text{ng}/\mu\text{L}$  a été dosée à l'aide d'un Nanodrop. L'ADN a ensuite été précipité avec 0,1 volume de sodium d'acétate (3M, pH 5,2) et de 2 volumes d'EtOH à 100%. Après une nuit d'incubation à -20°C, l'ADN des clones a été centrifugé à 15 000 rpm à 4°C, et ce pendant 15 minutes. Le surnageant a été retiré et le culot lavé avec 500  $\mu\text{L}$  d'EtOH à 70%. L'ADN a été centrifugé une nouvelle fois à 4°C pendant 5 minutes à 15 000 rpm. Le surnageant retiré, l'ADN a été laissé à sécher sous une hotte. Après le séchage, l'ADN a été suspendu dans de l'eau MiliQ. Un dosage a finalement été effectué pour connaître la concentration finale en  $\text{ng}/\mu\text{L}$  de l'ADN bactérien. Pour chaque clone, la concentration finale en ADN était comprise entre 100 et 500  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .

### 2.2.2 Séquençage

Pour séquencer, environ 10  $\mu$ L de chaque clone bactérien ont été déposés dans un tube PCR. Une amorce universelle pour les clones d'ARNi de *C. elegans*, mhl-39 (5' GAGGAAGCAACCTGGC 3'), a été utilisée pour séquencer l'insert. Un séquençage Sanger a été effectué pour connaître la séquence d'ADN (Génome Québec).

## 2.3 ARN interférence

### 2.3.1 Description des bases du système

Pour effectuer les expériences d'ARNi, la souche bactérienne HT115(DE3) a été utilisée (Timmons et Fire, 1998). Cette souche est résistante à la tétracycline et est un lysogène d'un opéron intégré dans le chromosome bactérien contenant le gène codant pour l'ARN polymérase T7, ainsi que le gène codant pour la résistance à la tétracycline, sous le contrôle d'un promoteur "Lac" inductible par l'IPTG. Ainsi, la bonne souche bactérienne peut être sélectionnée par la tétracycline. De plus, cette souche bactérienne est mutante pour l'enzyme ARNase III, qui normalement dégrade l'ARN double brin, ce qui permet l'accumulation de grandes quantités d'ARN double brin (ARNdb) dans les bactéries.

Ce fond génétique bactérien [souche HT115(DE3)] est alors transformé avec le plasmide souhaité pour exprimer de l'ARNdb visant la déplétion des transcrits du gène correspondant. Tous les plasmides pour l'ARNi de *C. elegans* partagent le même squelette contenant la séquence spécifique d'un gène de *C. elegans* cloné entre deux promoteurs de l'ARN polymérase T7 situés de part et d'autre du gène d'intérêt. Cela permet une transcription bidirectionnelle du gène, formant ainsi l'ARNdb lui correspondant (Kamath *et al.*, 2001; Timmons *et al.*, 2001). De plus, ce plasmide possède une séquence de résistance à l'ampicilline, ce qui assure sa sélection. Comme contrôle systématique des expériences d'ARNi, le plasmide d'ARNi "vide" L4440,

nommé "EV" dans ce mémoire, pour "*empty vector*" puisqu'il ne contient pas d'insert de gène de *C. elegans*, a été utilisé (Andersen *et al.*, 2008; Timmons et Fire, 1998).

### 2.3.2 Culture bactérienne

Dans un premier temps, à l'aide d'un cure-dent stérile, le clone d'intérêt a été décongelé à partir de notre base de données. Chaque clone a été étalé sur une plaque de Pétri contenant du LB-Agar où deux antibiotiques ont été ajoutés : de l'ampicilline, concentrée à 75  $\mu\text{g/mL}$ , et de la tétracycline, concentrée à 12,5  $\mu\text{g/mL}$  (Timmons *et al.*, 2001; Wang et Barr, 2005). Puis, chaque clone bactérien utilisé pour faire l'ARNi a été cultivé pendant 18h à 37°C et ce dans l'obscurité, la tétracycline étant sensible à la lumière.

Par la suite, une colonie isolée a été récupérée avec un cure-dents stérile et a été placée dans 1 mL de LB supplémenté de 75  $\mu\text{g/mL}$  d'ampicilline et de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  de tétracycline. Cette préculture a été cultivée à 37°C pendant 18 h avec une agitation de 200 rpm (Figure 2.1 A). Puis, 100  $\mu\text{L}$  de cette préculture ont été ajoutés dans des tubes à centrifugeuses de 50 mL, avec 15 mL de LB supplémenté de 75  $\mu\text{g/mL}$  d'ampicilline. La tétracycline n'a pas été ajoutée à cette dernière étape de culture, car son ajout entraîne une diminution des effets de l'ARNi (Kamath *et al.*, 2001). Ces cultures de 15 mL ont été cultivées pendant 14 à 15 h dans un incubateur à 37°C avec une agitation de 200 rpm. Suite à cette incubation, 1 mM d'IPTG a été ajouté au milieu de culture, puis remis à l'agitation à 200 rpm à 37°C pendant 1 h (Figure 2.1 A) pour déclencher la synthèse des ARNdb et augmenter l'efficacité de l'ARNi. Afin de concentrer les bactéries, les tubes les contenant ont été centrifugés dans une centrifugeuse Avanti J-E de la marque Beckman Coulter avec un rotor JA-17, à 3000 rpm pendant 10 min à une température de 4°C. Le surnageant a été retiré pour ne laisser qu'environ 1 mL de LB,

puis le culot bactérien a été resuspendu en vortexant jusqu'à sa dissolution (Figure 2.1 A).

Dans le cas de l'ARNi double des gènes *lam-2* et *lam-1*, les deux clones bactériens ont été cultivés séparément et n'ont été mélangés, en quantités similaires et vortexés, qu'avant l'ensemencement sur les plaques NGM.

Finalement, ces bactéries concentrées et resuspendues ont été utilisées pour préparer les plaques de nématodes NGM fraîchement fabriquées, en les ensemençant avec 100  $\mu$ L de la culture bactérienne pour chaque plaque. Ces plaques ensemençées ont été incubées, dans le noir, à 20°C pendant 24 à 48 h avant d'y déposer les vers afin que le tapis bactérien soit complètement sec (Figure 2.1 A).

### 2.3.3 Préparation des plaques NGM pour l'ARNi

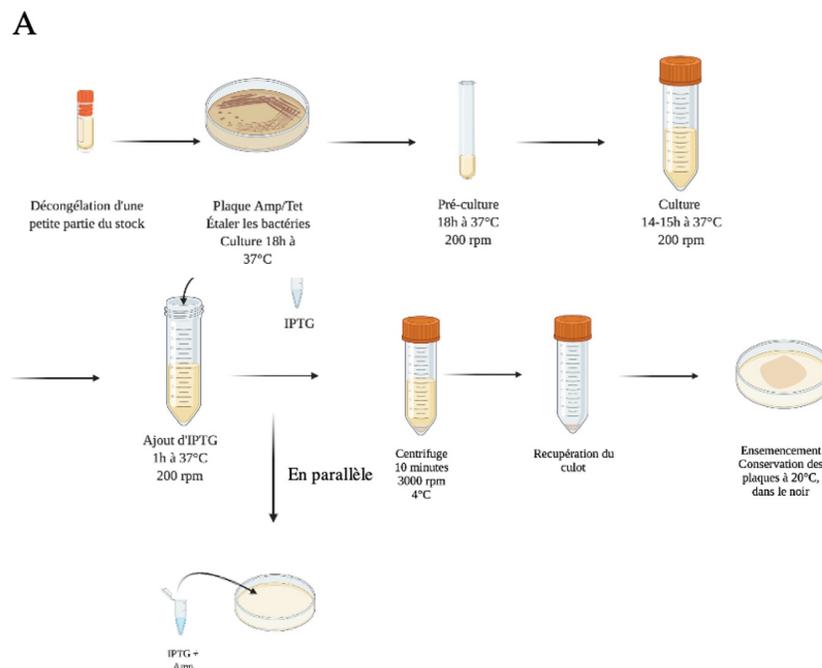
Afin d'augmenter l'efficacité de l'ARNi et d'éviter les contaminations bactériennes, les plaques NGM ont été supplémentées d'un mélange de 75  $\mu$ g/mL d'ampicilline et de 1 mM d'IPTG, et ce avant d'ensemencer les cultures bactériennes sur ces plaques. Une quantité de 20 $\mu$ L de ce mixte a été étalé sur chacune des plaques nécessaires pour l'expérience, puis elles ont été conservées à température ambiante et dans le noir, jusqu'à l'ensemencement avec la bactérie.

### 2.3.4 Synchronisation des nématodes

Pour obtenir suffisamment de nématodes d'âge identique pour les expériences d'ARNi, ceux-ci ont été synchronisés selon l'adaptation des protocoles de (Porta-de-la-Riva *et al.*, 2012; Stiernagle, 2006). Quelques jours avant la synchronisation, environ 250 vers aux stades L1 à L3 ont été déposés sur 5 plaques ensemençées de la bactérie

traditionnelle OP50. Ces plaques ont été lavées avec 600  $\mu\text{L}$  d'eau MiliQ pour récupérer les vers gravides, qui ont été déposés dans un tube Falcon de 15 mL. Les plaques de vers furent par la suite relavées, avec environ 1 mL d'eau MiliQ par plaque, et grattées avec une spatule (faite à partir d'une pipette Pasteur) pour récupérer les embryons qui tendent à rester collés sur la surface des plaques. Puis, 600  $\mu\text{L}$  ont été utilisés sur chaque plaque pour un troisième lavage afin de récolter le plus d'embryons possible. Tous les vers ainsi récoltés ont ensuite été centrifugés au niveau 4 (soit environ 2000 rpm), pendant 3 min dans une centrifugeuse Clinical (marque IEC), avec un rotor 215. Les vers ont ensuite décanté pendant 5 min dans de la glace. Le surnageant a été enlevé, pour ne laisser que 1,5 mL. Les vers contenus dans ces 1,5 mL ont été transférés dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Les vers ont été centrifugés dans une centrifugeuse « Centrifuge 5424 » de la marque Eppendorf, à 1500 rpm pendant 2 minutes (Figure 2.1 B). Les tubes Eppendorf contenant les vers ont ensuite reposés quelques minutes dans la glace. Le surnageant a été retiré pour qu'il ne reste qu'entre 100 et 250  $\mu\text{L}$ . Les vers ont ensuite été traités avec une solution de javel maison pour y libérer les embryons qui sont résistants grâce à leur coquille de quitine (tous les vers sont dégradés par la javel). Cette solution de javel maison contient 500  $\mu\text{L}$  d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 1M et de 200  $\mu\text{L}$  d'hypochlorite de sodium 5%, ajoutés dans l'Eppendorf contenant les vers. Les vers ont été agités manuellement pendant 4 à 6 minutes, jusqu'à ce qu'ils se dissolvent et qu'il ne reste que les embryons. Les tubes ont été centrifugés pendant 2 min à 1500 rpm. Puis deux lavages avec environ 1 mL d'eau MiliQ ont été effectués. Entre chaque lavage, les nématodes étaient centrifugés et le surnageant retiré pour ne laisser qu'entre 100 et 250  $\mu\text{L}$  de culot d'embryons. Deux autres lavages ont été effectués de la même façon, mais avec une solution de M9 (tampon physiologique pour *C. elegans* préparé tel que décrit (Stiernagle, 2006)). Après les deux lavages au M9, le surnageant a été retiré et 1 mL de M9 a été ajouté (Figure 2.1 B). Un nouveau tube Falcon de 15 mL a été rempli avec 1 mL de M9 et les vers contenus dans l'Eppendorf y ont été ajoutés.

Le développement de cette population d'embryons ainsi synchronisés a ensuite lieu dans le tampon M9 dans lequel les embryons éclosent et restent en suspension au stade larvaire L1 en absence de nourriture (Figure 1.3), ce qui permet de synchroniser les populations de nématodes. Pour ceci, les tubes Falcon contenant les vers décrits ci-dessus ont été mis sur un agitateur Nutator (ADAMS) dont l'agitation est de 12 rpm à un angle de 20° pendant environ 24 h. À la fin de cette incubation, les tubes Falcon de 15 mL ont été placés dans de la glace pendant 5 min pour concentrer les vers par décantation, puis centrifugés au niveau 4 (environ 2000 rpm) dans une centrifugeuse Clinical pendant 3 min. Le surnageant a été retiré pour qu'il ne reste qu'entre 250 et 500  $\mu$ L contenant les vers. Finalement, entre 5 et 20  $\mu$ L (selon la quantité de larves L1 présent dans les tubes Falcon) de liquide contenant les larves ont été déposés sur chacune des plaques d'ARNi préalablementensemencées de bactéries HT115(DE3) tel que décrit en 2.3.2 et 2.3.3. Celles-ci ont ensuite été incubées à 20°C durant 48 à 86 h selon l'expérience voulue (Figure 2.1 B).



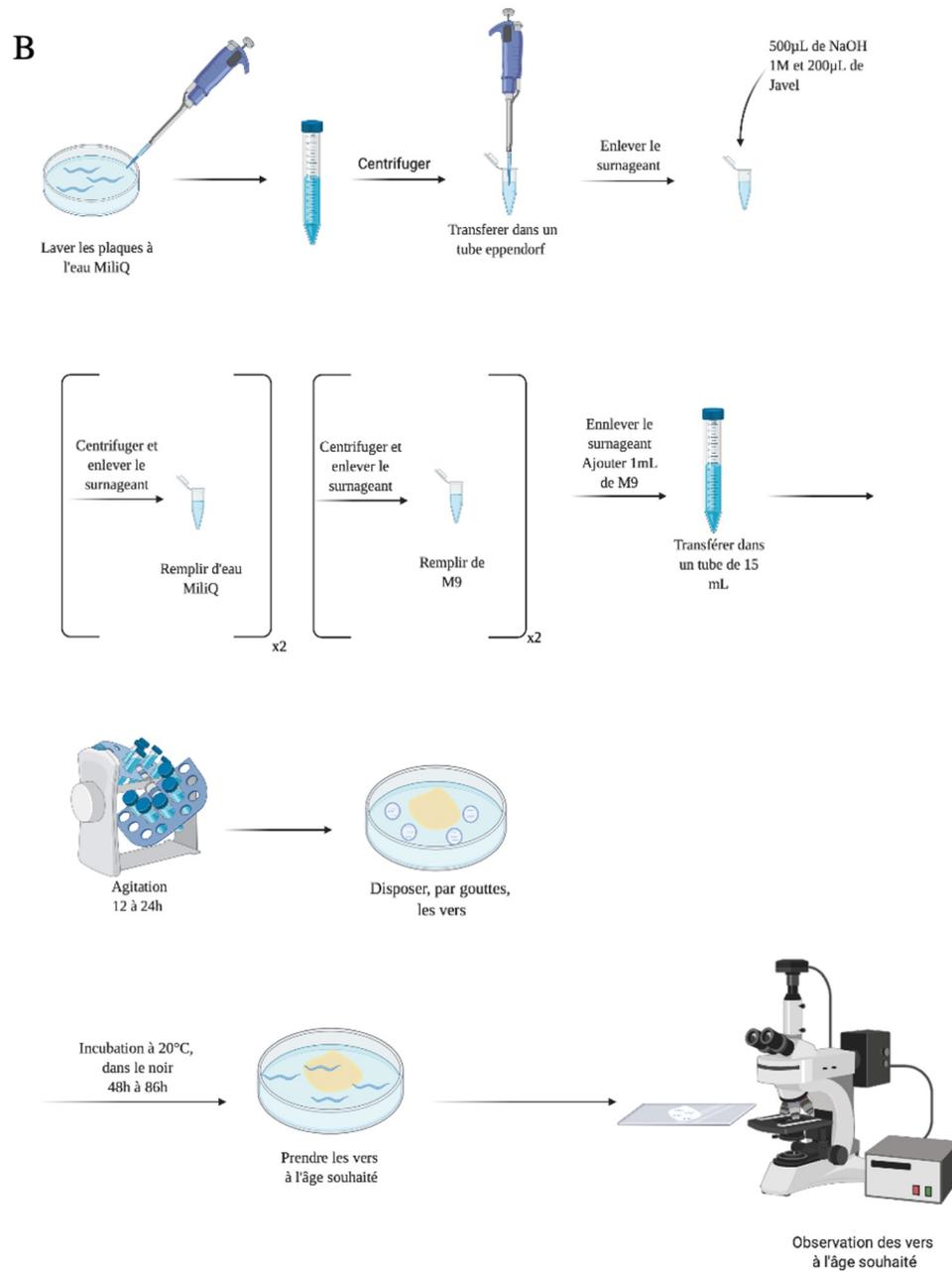


Figure 2.1 Schémas expérimentaux de la culture des clones bactériens pour l'ARNi (A) et de la synchronisation des vers pour leur observation 48 à 86h après leur dépôt sur les plaques d'ARNi (B). Schéma réalisé avec BioRender.

## 2.4 Microscopie et observations de la neuroanatomie

La neuroanatomie a été examinée sur des animaux de type sauvage en utilisant des rapporteurs transgéniques stables (intégrés dans le génome de *C. elegans*) spécifiques aux structures étudiées. Pour immobiliser les vers pour la microscopie, ils ont été montés sur un cousin d'agarose 5% présent sur des lames de verre. Les animaux ont été anesthésiés avec de l'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) concentré à 75 mM. Les vers ont été observés avec un Nomarski ou un microscope à fluorescence (Carl Zeiss Axio Scope.A1 ou Axio Imager.M2) et les images ont été acquises avec la caméra AxioCam (Zeiss) et traitées avec le logiciel AxioVision (Zeiss).

#### 2.4.1 Analyse des ganglions de la tête : les neurones ASH/ASI et le neuropile

Les soma des neurones chimiosensoriels ASH et ASI et le neuropile sont situés au niveau des ganglions de la tête du ver. Ces structures ont été visualisées avec la souche *hdlIs26*, dont le rapporteur *sra-6p::DsRed2; odr-2p::cfp* est intégré dans le génome de vers de type sauvage (Schmitz et al., 2008). Cette insertion permet l'observation par la fluorescence rouge de quatre neurones dans la tête des nématodes : ASH (droit et gauche), et ASI (droit et gauche), ainsi que de leurs axones qui se trouvent dans le neuropile. Chez les vers du type sauvage, chacun des deux soma de ASH et de ASI se situe postérieurement au neuropile (Figure 2.2 A). Les animaux dont au moins un soma touchait, chevauchait ou était antérieur au neuropile étaient considérés comme mutants (Figure 2.2 B). De plus, chez les vers de type sauvage, le neuropile est antérieur au bulbe terminal du pharynx des animaux. Les animaux dont le neuropile se situait au milieu du bulbe terminal du pharynx, ou encore plus postérieur, étaient comptés comme mutants (Figure 2.2 C), alors que ceux dont le neuropile était antérieur et à proximité du bulbe terminal étaient comptés comme de type sauvage. Sauf dans le cas de l'ARNi de *mig-6*, où le neuropile est plus antérieur que la normale.

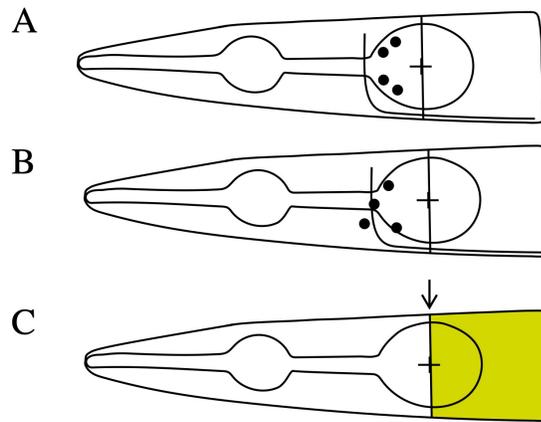


Figure 2.2 Types de défauts observés pour les neurones ASH et ASI. Chez le type sauvage, les soma des neurones (•) sont postérieurs au neuropile (A) alors que certains vers présentent des soma antérieurs ou qui touchaient le neuropile (B). Les vers étaient considérés comme mutants lorsque le neuropile était postérieur au grinder du pharynx, soit placé dans la zone verte (C).

#### 2.4.2 Observation de la fluorescence de LAM-2 et de EMB-9

La visualisation de la laminine  $\gamma$  et du collagène de type IV a été permise grâce à la souche *lam-2(qy20) qyIs46* (cette étude). Le rapporteur *lam-2::mNG + LOxP* du marqueur *lam-2(qy20)*, intégré au génome du ver par CRISPR dans le locus du gène *lam-2* (Keeley *et al.*, 2020), a permis de visualiser la laminine  $\gamma$ . Le rapporteur *emb-9::mCherry* du marqueur *qyIs46* (une insertion multicopie) a rendu possible l'observation du collagène de type IV.

#### 2.4.3 Analyse des structures présynaptiques de neurones GABAergiques de la corde dorsale

Les structures présynaptiques de neurones GABAergiques de la corde dorsale se situent au niveau du dos des animaux. Les synapses de cette corde dorsale ont été observées grâce à une version modifiée de la souche *juIs1* (Hallam et Jin, 1998), dont le rapporteur *unc-25p::snb-1::GFP* a été intégré dans le génome de vers de type sauvage.

Ce rapporteur permet l'observation des structures présynaptiques des neurones GABAergiques.

Chez le type sauvage, il est possible de constater une grande variabilité dans la distribution des synapses ainsi que dans la fluorescence des puncta ou regroupements synaptiques (Figure 2.3). Afin de photographier les vers, ceux-ci ont été roulés en position ventrale pour présenter leur dos, puisqu'ils se présentent naturellement sur leur côté. Cette position ventrale permet une observation plus précise de la corde dorsale. Puis, une section postérieure à la vulve d'environ 200  $\mu\text{m}$  a été photographiée afin de mettre en évidence la présence ou non de défauts (Figure 2.3).

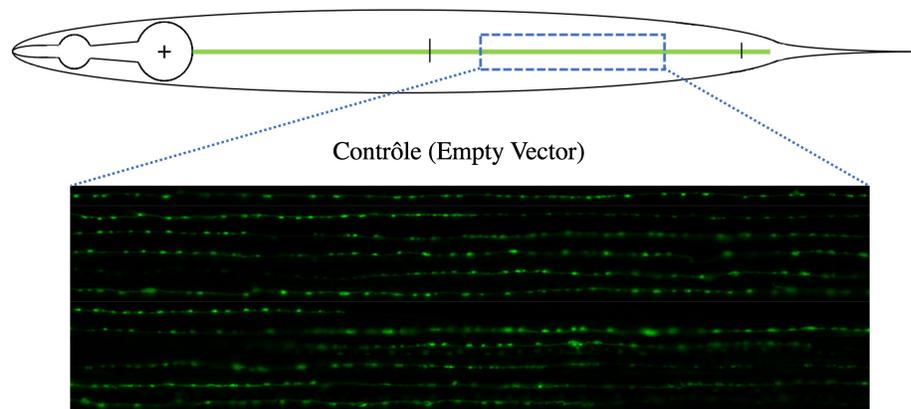


Figure 2.3 Schéma de la zone de la corde dorsale sélectionnée pour faire les quantifications. La zone choisie est représentée par un encadré bleu. Une compilation de quelques cordes dorsales, pour cette section de 200  $\mu\text{m}$ , de vers traités avec le contrôle EV montre la variabilité de la distribution des synapses de la corde dorsale.

## 2.5 Traitement des images

Les images de microscopie obtenues ont été traitées avec le logiciel ImageJ et la déconvolution des images représentant les ganglions de la tête a été faite avec le logiciel AutoQuant X3. Pour l'analyse des synapses de la corde dorsale, l'image d'un seul plan par ver a été prise. Celles-ci ayant été prises au grossissement de 63X, leur échelle a

été fixée à  $0,14 \mu\text{m}$  pour un pixel. Une zone de  $200 \mu\text{m}$ , postérieure à la vulve, de la corde dorsale a donc été utilisée.

Afin de déterminer les meilleurs paramètres pour la quantification, une quinzaine de cordes dorsales de vers traités avec le contrôle EV et de vers, choisis au hasard, dont un gène a été déplété ont été utilisés comme référence. Pour mettre en évidence la corde dorsale, le fond a été supprimé avec la fonction « Rolling Ball » de ImageJ (Figure 2.4). Après des essais entre les chiffres arbitraires de 5 à 40 (avec des bonds de 5), sur la quinzaine de cordes dorsales de référence, le chiffre arbitraire de 15 a été déterminé comme étant le plus juste (Figure 2.4 A). La corde dorsale a ensuite été tracée manuellement avec l'outil « Segmented line » avec une largeur de 35 pixels et la ligne dessinée a été redressée avec l'outil « Straighten ». Une zone de  $50,12 \mu\text{m}$  sur  $4,90 \mu\text{m}$  a été sélectionnée dans le but de faire les quantifications. Chaque image a été convertie au format 8-bit et dupliquée pour garder une version intouchée pour réaliser les analyses. Pour sélectionner les puncta, un seuil de gris de 55 sur 255 a été appliqué au duplicata de chacune des images avec la fonction « Threshold » (Figure 2.4 B). Ce seuil de 55/255 a été déterminé suite à l'analyse d'une dizaine de cordes dorsales de vers traités avec le contrôle EV et de vers dont un gène a été déplété, ces derniers ayant été choisis au hasard. L'analyse ayant été effectuée par bonds de 5 entre les seuils de 15/255 et 80/255 (Figure 2.4 B).

Pour que deux puncta à proximité ne soient pas compté comme un seul puncta, l'outil « Watershed » a été utilisé pour définir les limites. Finalement, le filtre déterminé par le « threshold » a été redirigé (avec la fonction « Redirect to » de l'onglet « Set Measurements ») vers l'image préseuil afin d'extraire les données de ces puncta uniquement.

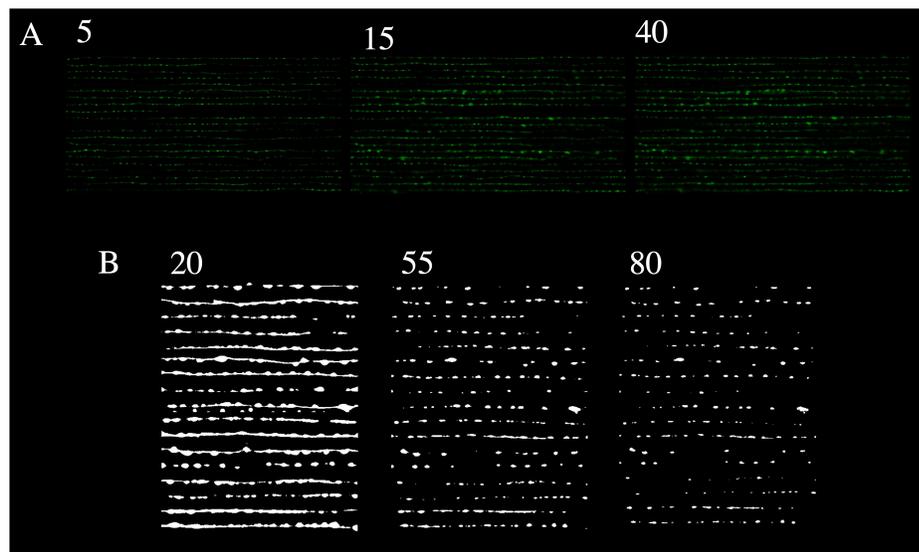


Figure 2.4 Représentation de quelques cordes dorsales qui ont servi à sélectionner les paramètres de quantification. L'élimination du bruit de fond ne correspondant pas à la corde dorsale a été déterminée avec la fonction « Rolling ball » en testant les unités arbitraires situées entre 5 et 40, par bond de 5 (A). La sélection du seuil de gris, permettant de séparer les puncta, a été réalisé en utilisant la fonction « Threshold » en faisant des bonds de 5 entre les seuils de 15/255 et 80/255.

## 2.6 Quantifications et analyses statistiques

Les mesures extraites des images ont été exportées dans MS Office Excel. Les quantifications, les analyses statistiques et les graphiques ont été effectués avec le logiciel RStudio ou MS Office Excel.

L'analyse statistique des résultats des ganglions de la tête a été réalisée à l'aide de test Z pour comparer les proportions (données qualitatives). Dans le but de déterminer s'il y avait une différence significative entre des synapses de la corde dorsale, des analyses de variances avec un test ANOVA à un facteur a été réalisé. Suite à une différence significative entre le contrôle EV et les clones observés, deux types de tests ont été appliqués : soit un test Post-Hoc de Tukey, soit des tests paramétriques ou non paramétriques (en cas d'ANOVA non paramétrique) de Wilcoxon-Mann-Whitney avec une correction de Bonferroni.

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

#### 3.1 Stratégie du crible par ARNi

Dans le but de mettre en évidence le rôle de la matrice extracellulaire dans la maintenance neuronale, un crible génétique a été effectué. Deux grandes catégories de cribles génétiques peuvent être faites : des cribles classiques et des cribles inverses (Figure 3.1). Lors d'un crible génétique classique, des mutations sont engendrées par un mutagène au hasard dans le génome et s'en suit la recherche de mutants présentant un phénotype désiré, généralement, dans la progéniture de la deuxième génération. Pour réaliser ce type de crible, des vers P0 au 4<sup>e</sup> stade larvaire (L4) sont mutagénisés de différentes façons (Figure 3.1A). Les plus communes étant de façon chimique par EMS (Ethyl methanesulfonate) ou par irradiation. Des animaux de la progéniture (F1) des vers mutagénisés sont ensuite transférés dans de nouvelles plaques, à raison d'un vers par plaque (Figure 3.1A). La progéniture F2 est ensuite observée afin de trouver le phénotype recherché (Kutscher et Shaham, 2014). Une fois le phénotype recherché trouvé, des analyses génétiques s'en suivent pour déterminer si le phénotype est causé par une ou plusieurs mutations, si la mutation est homozygote, récessive ou dominante, etc. (Figure 3.1A). Des croisements préparatoires sont effectués en vue de séquencer le génome entier afin de déterminer le gène causant ce phénotype (Doitsidou *et al.*, 2016). Les cribles génétiques classiques sont puissants, car ils représentent une interrogation non biaisée des phénomènes biologiques, mais ils sont très longs à effectuer et des

milliers de vers sont manipulés afin d'obtenir un mutant avec le phénotype recherché, et cela prend plusieurs années avant d'obtenir des résultats.

En revanche, les cribles génétiques inverses sont beaucoup plus rapides à effectuer. Ils consistent à préalablement sélectionner les gènes d'intérêts, basés sur leur identité moléculaire connue, et d'altérer leur fonction pour en étudier le phénotype (Figure 3.1B) (Ahringer, 2006). C'est un processus qui est beaucoup plus rapide que le crible génétique classique, puisque les gènes étudiés sont préalablement connus et aucune analyse, aucun séquençage et aucun sauvetage ne sont nécessaires pour déterminer la cause du phénotype. Le crible inverse peut être fait de deux façons : créer des mutants où le gène d'intérêt est délété ou supprimer la fonction du gène d'intérêt en utilisant l'ARNi (Figure 3.1B)(Ahringer, 2006). Dans le cadre de ce projet, la délétion n'était pas envisageable, puisque de nombreux gènes de la matrice extracellulaire sont létaux lorsqu'ils sont absents chez l'embryon (Guo *et al.*, 1991; Smyth *et al.*, 1999). De plus, l'objectif de cette recherche est d'étudier le système nerveux après son développement qui est largement complété au premier stade larvaire (L1). Le crible de génétique inverse par ARNi a été privilégié pour ces deux raisons.

L'ARNi est une approche qui permet de supprimer la fonction d'un gène de façon ciblée, sans altérer de façon permanente l'ADN du ver (Ahringer, 2006). Chez le ver, l'ARNi peut se faire de trois façons : par injection, par trempage ou par l'alimentation. L'ARNi par injection consiste à injecter l'ARNdb, préalablement préparé, directement dans la gonade du ver. En général, toute la progéniture du ver injecté avec l'ARNdb verra le gène ciblé être déplété (Ahringer, 2006). Cette première approche est très efficace, mais plus longue que les autres, puisque l'injection doit se faire ver par ver. Le deuxième moyen de faire l'ARNi avec *C. elegans* est de les tremper dans une solution très concentrée d'ARNdb. Cette approche-ci permet d'observer des dizaines

voire des centaines de vers ou leur progéniture (Ahringer, 2006). Cependant, il y a souvent des problèmes de stabilité de l'ARNdb.

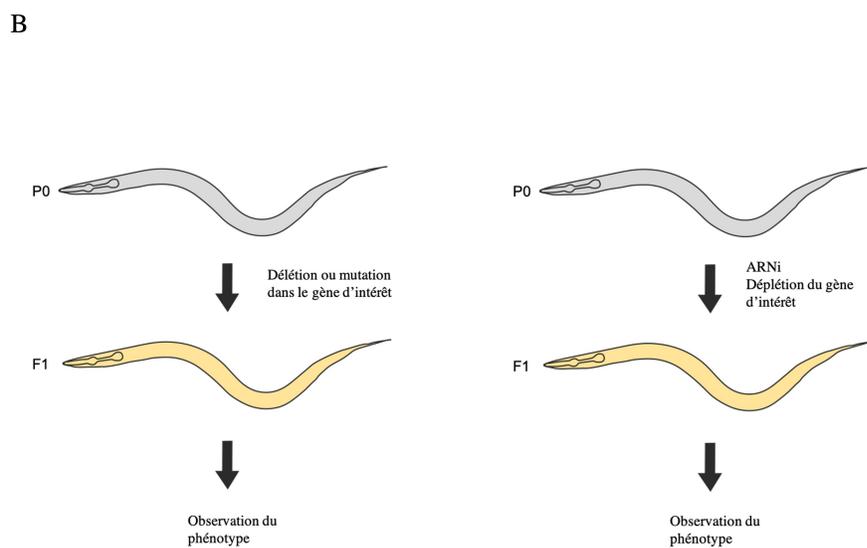
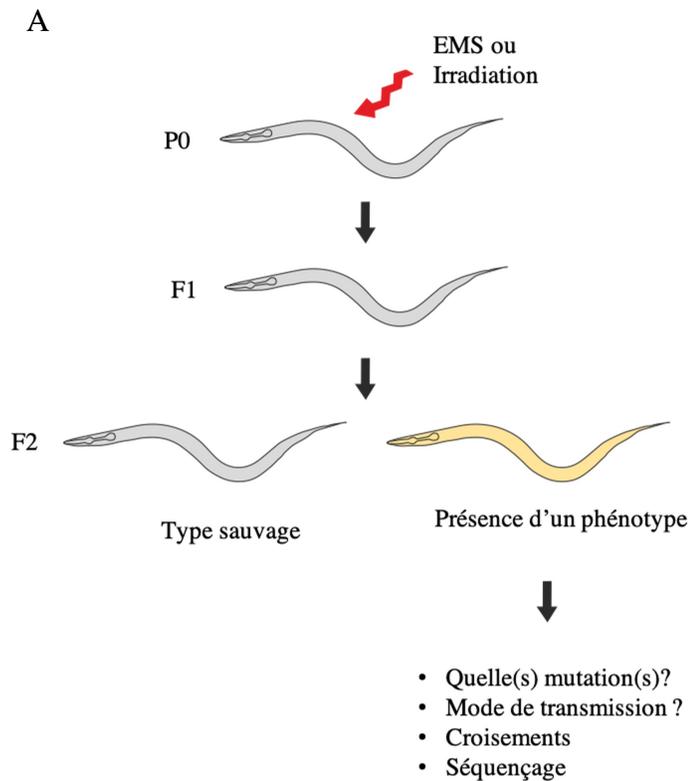


Figure 3.1 Représentation des deux types cribles génétiques possibles : le crible génétique classique (A) et le crible génétique inverse (B). Après l'induction de mutations sur les vers P0, leur progéniture (F1) est séparée, avec un ver par plaque, puis les vers F2 sont observés à la recherche d'un phénotype. Quand un phénotype intéressant est trouvé, les vers sont séquencés pour déterminer la ou les mutations et le type de transmission (A). Deux façons de faire un crible inverse : introduire une mutation dans le gène désiré ou déplété le gène d'intérêt par ARNi. Schéma adapté de (Kutscher et Shaham, 2014).

L'approche privilégiée dans ce projet a donc été l'ARNi effectuée via l'alimentation sur les plaques NGM puisqu'elle est l'approche la mieux adaptée pour un crible et utilise des réactifs déjà disponibles dans la communauté, sans avoir à synthétiser de l'ARN *in vitro* pour chaque gène ciblé. Cette façon de faire l'ARNi consiste à remplacer la nourriture habituelle des vers, qui est la bactérie OP50, par la souche bactérienne HT115(DE3) portant des copies d'un plasmide permettant à la bactérie de produire de l'ARNdb en grande quantité. Les vers se nourrissent de cette bactérie, incorporent l'ARNdb de façon systémique, et les transcrits du gène ciblé sont par conséquent déplétés.

En effet, ces plasmides dédiés à l'ARNi sont dérivés du plasmide de référence (ou "vide") L4440, et chacun contient un morceau de séquence codante pour chaque gène d'intérêt (Kamath *et al.*, 2001). Dans le plasmide, le gène d'intérêt est flanqué des promoteurs de l'ARN polymérase T7. Lors de la culture des clones bactériens, l'ajout d'IPTG au milieu de culture permet d'induire la transcription du gène d'intérêt, ce qui entraîne la formation de l'ARNdb correspondant au gène sélectionné (Chapitre 2 § 2.3). Après avoirensemencé les plaques NGM avec les cultures bactériennes d'ARNi, les vers déposés sur les plaques se nourrissent de ces bactéries contenant de l'ARNdb (Figure 3.2). Après l'ingestion de la bactérie, l'ARNdb sera importé par les cellules intestinales, puis propagé aux autres cellules, via le canal SID-1 qui est un transporteur d'ARNdb (Feinberg et Hunter, 2003; Whangbo *et al.*, 2017). L'ARNdb sera dans un premier temps coupé en petit ARN interférent (ARNpi) par DICER. Ces ARNpi seront ensuite rejoints par le complexe RISC qui va supprimer l'un des deux brins de l'ARNpi

pour en utiliser qu'un seul comme guide pour trouver l'ARNm correspondant au gène ciblé. Une fois l'ARNm ciblé trouvé par RISC, un clivage de l'ARNm s'amorce, ce qui empêche sa traduction et donc la synthèse de la protéine (Figure 3.2). L'ARNm clivé est dégradé alors que l'ARNpi est réutilisé comme guide pour dégrader d'autres ARNm du gène cible.

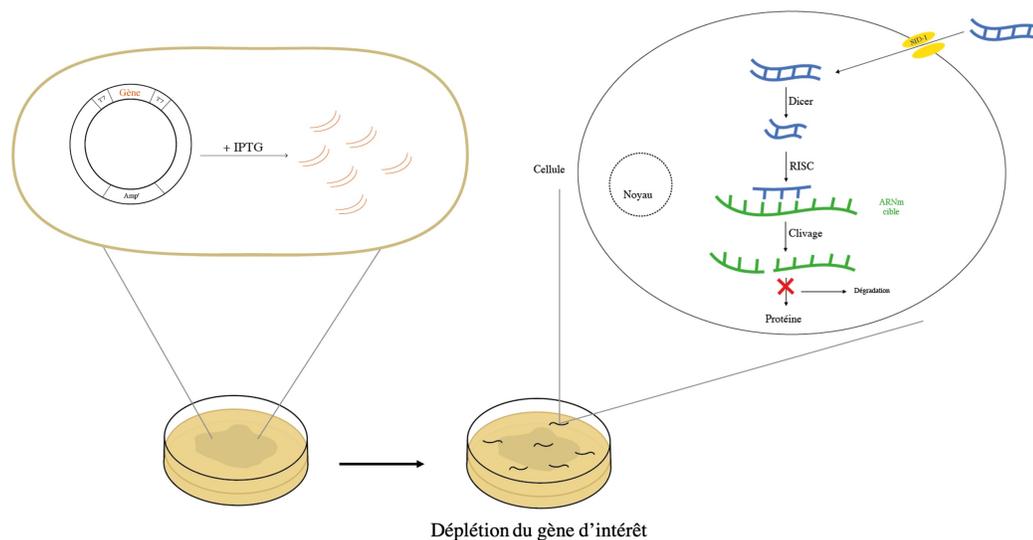


Figure 3.2 Schéma de l'ARNi par alimentation. Les bactéries contiennent des milliers de copies d'un plasmide où la séquence d'un gène de *C. elegans* est clonée. Lorsque les vers ingèrent la bactérie, les ARNdb contenus dans celle-ci vont diffuser dans les cellules du ver via le canal SID-1. Dans les cellules, Dicer et RISC vont permettre le clivage de l'ARNm correspondant au gène ciblé. Cela entraîne le clivage et la dégradation de l'ARNm empêchant la formation de la protéine, ce qui provoque la déplétion de la fonction du gène correspondant.

Dans cette étude, des vers synchronisés au milieu du 1<sup>er</sup> stade larvaire ont été utilisés pour faire le crible par ARNi (§ 2.3.3). Deux raisons majeures ont orienté le choix du stade pour commencer l'expérience. Premièrement, au premier stade larvaire (L1), la grande majorité du système nerveux est complètement développé. Cela nous permet d'étudier les effets post-développementaux de la déplétion du gène choisi et donc d'étudier la maintenance à long terme du système nerveux. Deuxièmement, les gènes de la matrice extracellulaire sont, pour la plupart, nécessaires au développement de

l'embryon. Ainsi, leur absence pendant l'embryogenèse entraînerait une létalité embryonnaire ou larvaire, ne permettant pas d'observer les animaux à l'âge adulte. Ceci est précisément évité grâce à la réalisation de l'ARNi qu'à partir du stade larvaire L1, ce qui résulte en la déplétion des transcrits du gène ciblé au plus tôt à partir de la fin de ce 1<sup>er</sup> stade larvaire. En pratique, l'ARNi sera puissante que lors des stades larvaires et adultes subséquents, car la machinerie d'ARNi prend 1 à 2 jours pour efficacement dépléter les transcrits, sans toutefois supprimer les protéines produites auparavant pendant l'embryogenèse.

Ainsi, dans le cadre de ce projet, un crible génétique inverse par ARNi, via l'alimentation, a été effectué. Dans un premier temps, des gènes de la matrice extracellulaire ont été sélectionnés grâce aux travaux et connaissances du laboratoire, et raffinés grâce à la lecture de la littérature scientifique. De nombreuses informations ont été recueillies sur chacun des gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire: nom, sous-unités, isoformes, allèles caractérisés et phénotypes, tant liés au système nerveux que plus généraux. Le lieu et le stade d'expression des protéines ont également été notés. Les informations concernant les interactions des protéines et de leurs sous-unités ont aussi été identifiées. De plus, l'implication du gène dans des maladies humaines connues a été répertoriée, ce qui enrichit la mise en contexte du rôle de la matrice extracellulaire dans les maladies humaines. Un critère pratique et très important pour la sélection des gènes du crible a été l'existence du clone bactérien correspondant dans la *C. elegans RNAi Library* (Kamath et Ahringer, 2003; Kamath *et al.*, 2003). Cette banque d'ARNi contient des clones bactériens, utilisables pour l'ARNi, et chacun d'eux exprime l'un des 19 000 gènes de *C. elegans*. Ce critère était essentiel pour faire un crible rapide, puisque la présence d'un clone dans cette bibliothèque économise le clonage du gène, permettant ainsi de gagner du temps, ce qui fut d'autant plus pertinent en temps de pandémie. Les gènes sélectionnés appartiennent à 3 catégories : (i) ceux codant pour des protéines structurales de la

matrice extracellulaire, (ii) des récepteurs des composants de la matrice extracellulaire et (iii) des protéines régulatrices ou modulatrices de cette matrice.

Dans un premier temps, 42 gènes codant pour 29 protéines différentes ont été sélectionnés. Deux gènes n'étant pas présents dans la *C. elegans RNAi Library* ont été mis de côté. Sur les 40 gènes restants, seuls 21 ont été étudiés (la copie de la *C. elegans RNAi Library* de McGill étant inaccessible dû aux mesures sanitaires en place pour la COVID-19). Chacun des 21 gènes a été individuellement déplété par ARNi. L'effet de la déplétion des gènes de la matrice extracellulaire a été évalué dans deux contextes différents du système nerveux : l'organisation des ganglions de la tête chez des animaux au premier jour (J1) et au deuxième jour (J2) de vie adulte, ainsi que la distribution des synapses de la corde nerveuse dorsale chez des animaux du stade jeune adulte. Ces deux contextes différents offrent la possibilité de détecter des effets sur le maintien de l'architecture neuronale, ainsi que de l'assemblage macromoléculaire synaptique au niveau de motoneurones.

### 3.2 Analyse des effets de la déplétion de gènes de la matrice extracellulaire sur l'organisation des ganglions de la tête

Pour étudier le rôle de la matrice extracellulaire dans la maintenance des ganglions de la tête, les paires de gauche et de droite des neurones ASH et ASI ont été observées. Ces quatre neurones ont été visualisés à l'aide du marqueur *hdlIs26* dont le rapporteur est *sra-6p::DsRED2; odr-2p::cfp*. Les 21 gènes sélectionnés ont été individuellement déplétés une fois par ARNi lors d'un premier criblage. Chaque analyse a toujours été faite en même temps que le contrôle « Empty Vector ». Pour chacun des 21 clones bactériens testés, 4 réplicats techniques ont été réalisés. Les vers ont été observés au premier et au deuxième jour de vie adulte.

Lors du crible, une attitude d'observation ouverte a été adoptée, sans se limiter à certains types de défauts particuliers établis au préalable. Toutefois, trois types de défauts ont été observés : (i) un déplacement des soma des neurones par rapport au neuropile, (ii) un déplacement du neuropile dans la direction postérieure, se retrouvant au niveau du bulbe terminal du pharynx, et (iii) un déplacement antérieur du neuropile par rapport au bulbe terminal (Figure 3.3).

Lors du premier essai pour chacun des 21 clones, aucun phénotype particulier ou significatif, par rapport au contrôle EV, n'a été observé suivant la déplétion post-développementale par ARNi pour 18 gènes (Figure 3.4). Cependant, l'ARNi post-développementale de trois gènes a révélé leur rôle potentiel dans la maintenance neuronale. Ces gènes sont *lam-2*, *gon-1* et *mig-6*.

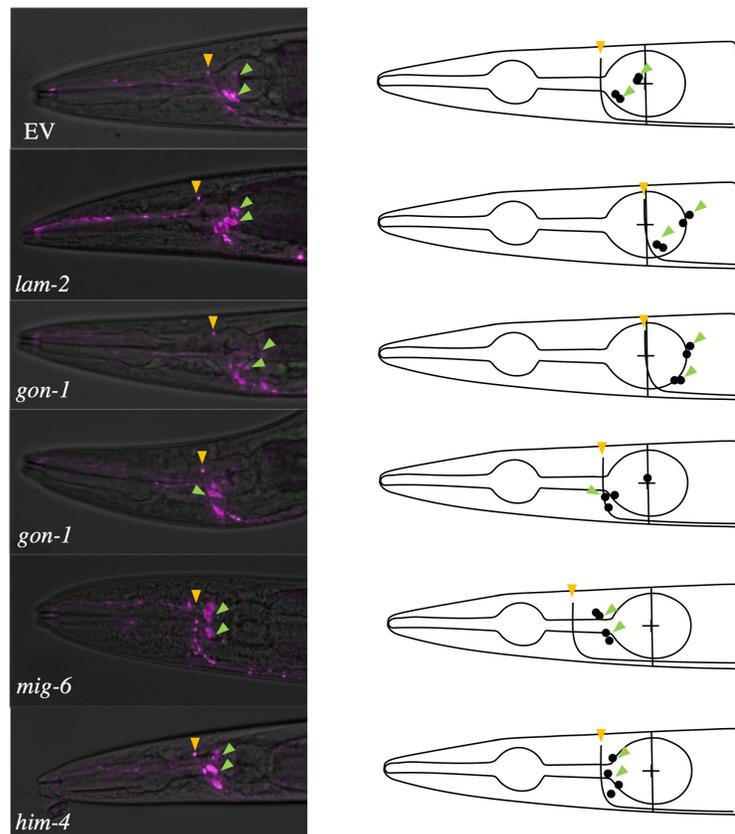
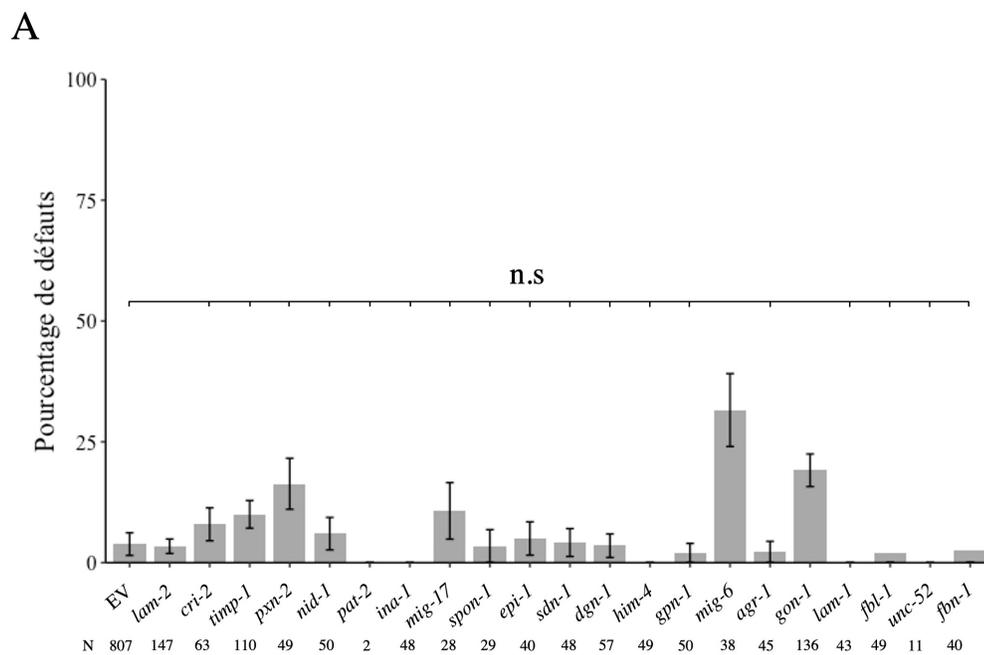


Figure 3.3 Placement de quatre neurones chimiosensoriels permettant d'évaluer l'organisation des ganglions de la tête suivant les traitements d'ARNi. Images de vers prises au microscope à fluorescence suite à l'ARNi (à droite) et leur représentation respective (à gauche). Le neuropile (▲) et les soma (▲) sont indiqués. Le contrôle EV, ainsi que la déplétion de *him-4* (montré ici comme contrôle négatif de déplétion d'un gène) ne présentent aucun défaut. La déplétion de *gon-1* entraîne deux types de défauts : un déplacement postérieur du neuropile et des somas des neurones, de sorte qu'ils se retrouvent au niveau du neuropile. La déplétion de *lam-2* entraîne un déplacement postérieur du neuropile alors que la déplétion de *mig-6* entraîne un déplacement antérieur.

Après avoir effectué ce premier passage de tous les clones, des essais supplémentaires ont été effectués avec les clones *lam-2* et *gon-1*, qui ont donné des résultats prometteurs, pour évaluer la reproductibilité des défauts.



B

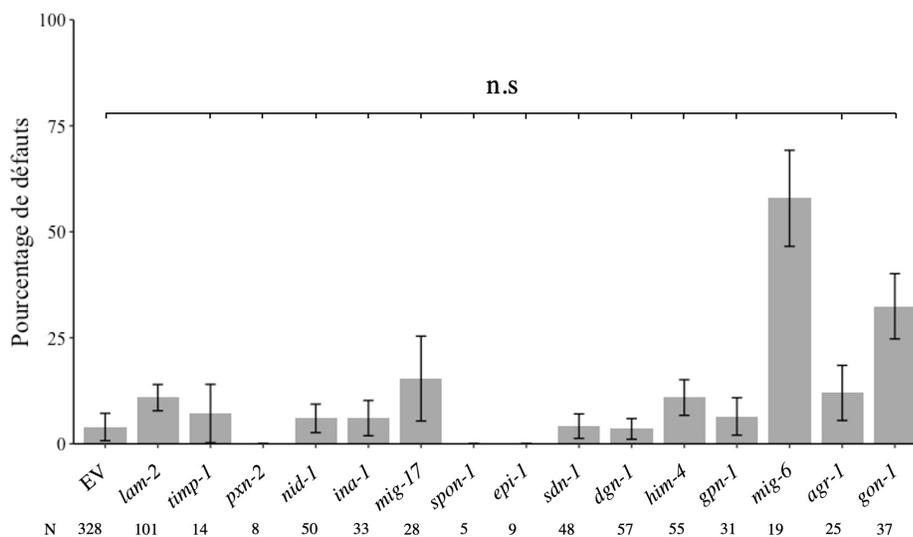


Figure 3.4 Pourcentage de vers présentant des défauts au premier jour de vie adulte (A) et au deuxième jour de vie adulte (B). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type de la moyenne (SEM). N= nombre d'individus observés. Le nombre d'individus varie entre les gènes, notamment dû à une variabilité du nombre de vers présents sur les plaques d'ARNi. De plus, la déplétion, par ARNi, de certains gènes entraîne la stérilité. À cause de la pandémie, la répétition des expériences, servant à augmenter le nombre de vers observés, a été rendue difficile. Dans le cas des contrôles EV, le nombre de vers indiqué représente la totalité des vers observés lors des expériences indépendantes d'ARNi.

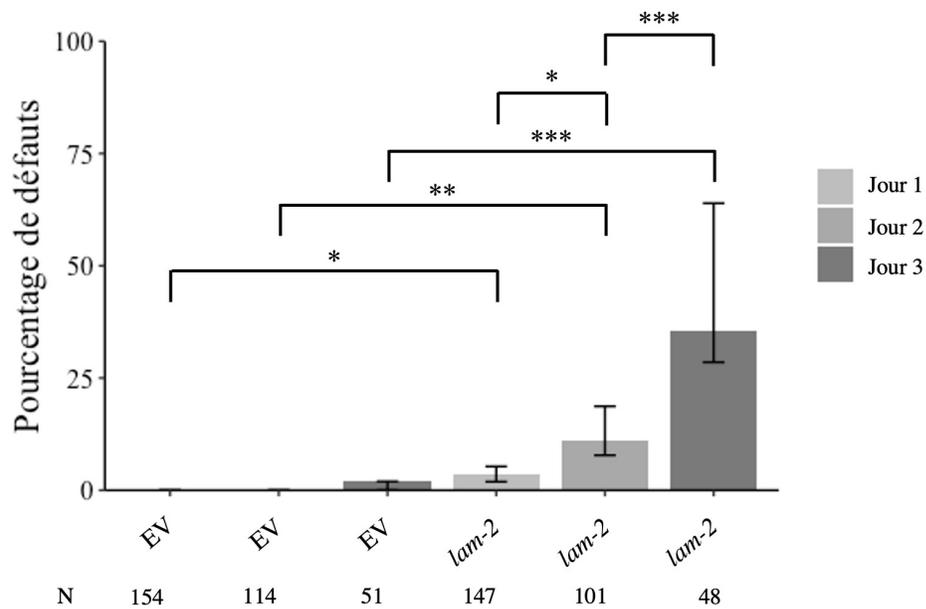
### 3.2.1 La laminine $\gamma$ semble jouer un rôle dans la maintenance neuronale

Après un premier essai prometteur, l'ARNi pour dépléter la fonction de *lam-2* a été effectuée 2 nouvelles fois pour avoir 3 réplicats biologiques. Pour chacun de ces réplicats biologiques entre 3 et 4 réplicats techniques ont été effectués.

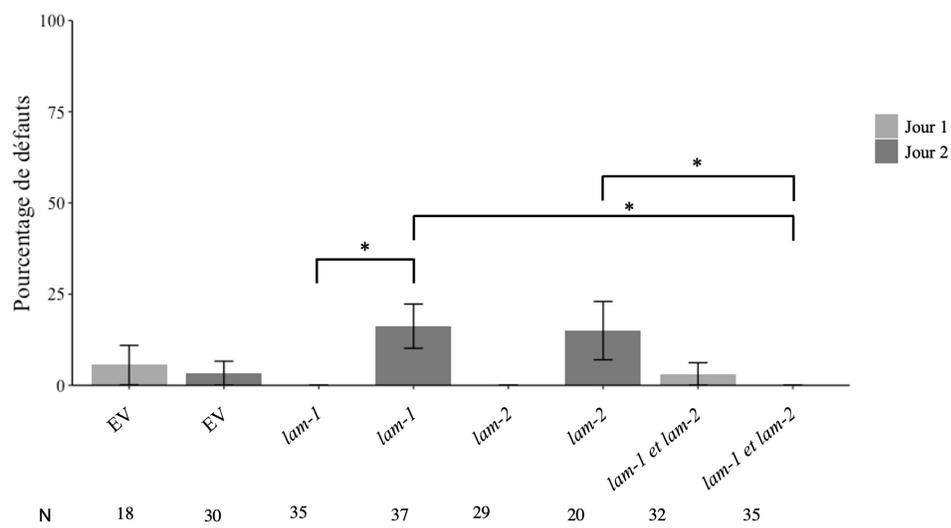
La déplétion post-développementale de la laminine  $\gamma$  (*lam-2*) résulte en un déplacement postérieur du neuropile par rapport au bulbe terminal du pharynx, ainsi que des soma des neurones chimiosensoriels ASI et ASH (Chapitre 2 § 2.4.1), contrairement aux vers contrôles nourris avec EV, chez lesquels la position du neuropile reste intacte. Ce type de défaut a été observé chez 3,4% des individus au 1<sup>er</sup> jour de vie adulte et chez 10,9%

des vers au 2<sup>e</sup> jour de vie adulte (Figure 3.5 A). Les défauts semblent donc progressifs au cours de la vie adulte des animaux.

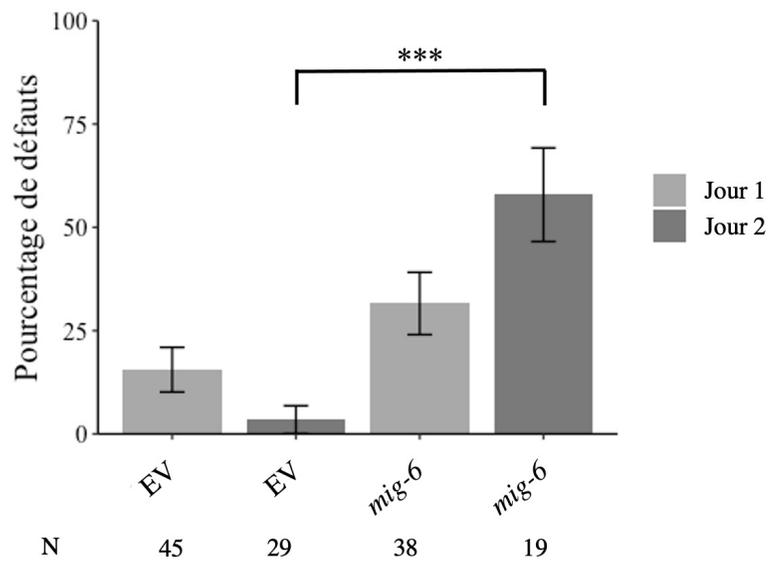
**A**



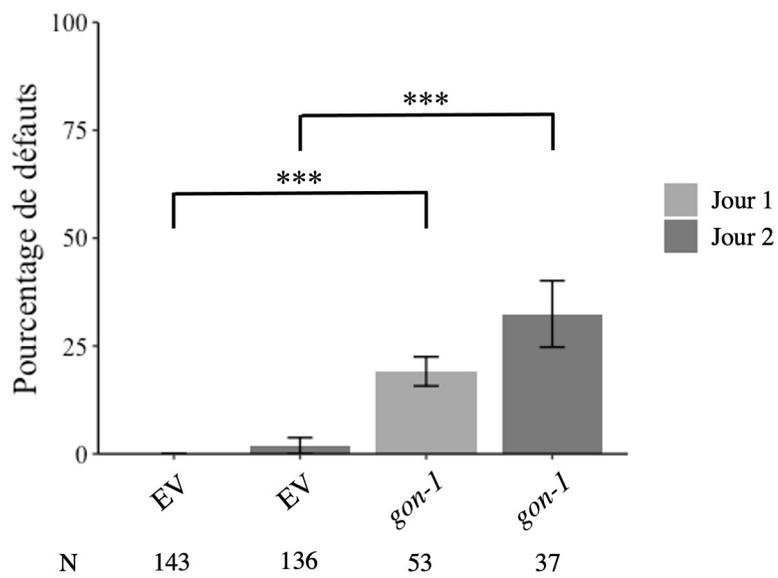
**B**



C



D



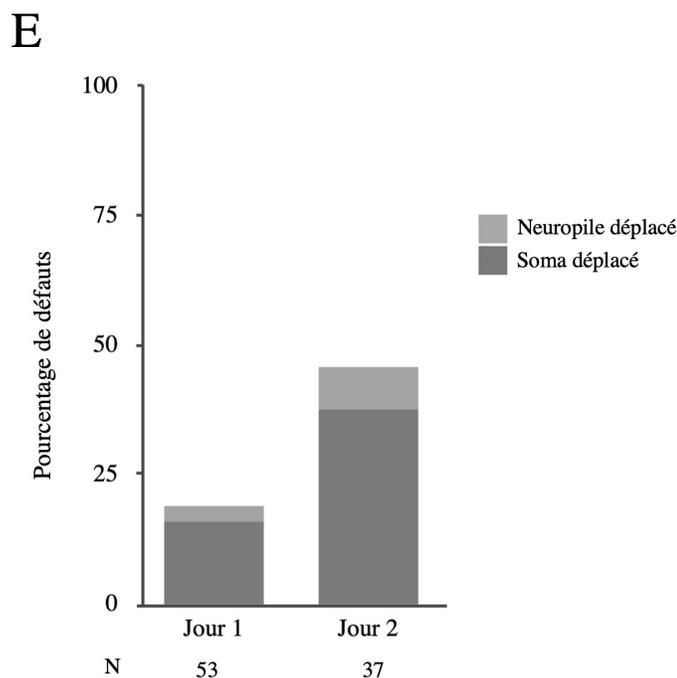


Figure 3.5 Gènes de la matrice extracellulaire dont la déplétion post-développementale par ARNi a montré un rôle dans la maintenance neuronale. Pourcentage de défauts lors de la déplétion de *lam-2* du premier au troisième jour de vie adulte (A). Déplétion simultanée de deux sous-unités de la laminine : *lam-1* et *lam-2* (B). Défauts en pourcentage après la déplétion du gène *mig-6* au premier et au deuxième jour de vie adulte (C). Représentation du pourcentage de défauts, au premier et au deuxième jour de vie adulte, après l'ARNi du gène *gon-1*(D). Types de défauts observés au premier et deuxième jour de vie adulte lors de la déplétion de *gon-1*. Il est à noter que seul l'ARNi de *gon-1* a présenté deux types de défauts simultanément. (E). Pourcentage de défauts : déplacement du neuropile (A à C) \* :  $p < 0.05$ ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\*  $p < 0.001$ . N= nombre d'individus observés.

Les défauts étant progressifs entre le premier jour et le deuxième jour de vie adulte des vers, nous avons regardé si le phénotype restait constant ou si les défauts devenaient plus importants au troisième jour de vie adulte. Les résultats confirment que les défauts sont progressifs, puisque 35,4% des animaux observés présentaient un déplacement postérieur du neuropile par rapport au bulbe terminal du pharynx (Figure 3.5 A).

Pour étudier le rôle plus global de la laminine, qui possède quatre sous-unités, dont le gène *lam-2* codant pour la sous-unité  $\gamma$  et le gène *lam-1* codant pour la sous-unité  $\beta$

(Kramer, 2005), nous avons testé si la déplétion des deux sous-unités pouvait augmenter la pénétrance des défauts. De manière surprenante, l'ARNi simultanée de *lam-1* et *lam-2* résulte en des défauts moins sévères qu'avec *lam-2* seul (Figure 3.5 B). Ces résultats semblent montrer que l'absence des deux sous-unités diminue la présence de défauts, et ce autant au premier qu'au deuxième jour de vie adulte. Il se peut que des mécanismes compensatoires soient mis en jeu, ou que ce soit simplement dû à la variabilité de l'ARNi (surtout lorsque deux clones bactériens sont combinés) qui a fait en sorte que cette expérience n'a pas aussi bien fonctionné sur les plaques avec la double ARNi (Chapitre 4 §4.1.1.3). Cette expérience d'ARNi double devrait être effectuée de nouveau en exposant les vers aux deux ARNd par une autre approche expérimentale.

### 3.2.2 Le gène *gon-1* joue un rôle dans la maintenance neuronale

Après un résultat prometteur au premier essai de la déplétion par ARNi de la fonction de *gon-1*, 3 autres réplicats biologiques ont été effectués. Pour chaque essai, entre 3 et 4 réplicats techniques ont été faits. Au premier jour de vie adulte, 19,1% des animaux (Figure 3.5 D) présentaient deux types de défauts : (i) les soma des neurones sont déplacés de sorte qu'ils sont à la même position antéro-postérieure que le neuropile ou qu'ils lui sont même antérieurs et (ii) un déplacement postérieur du neuropile et des soma, par rapport au bulbe terminal du pharynx (Figure 3.3; § 2.4.1). Au premier comme au deuxième jour de vie adulte, la majeure partie des défauts observés étaient des déplacements des soma : 16,2 % au jour 1 et 37,8% au jour 2 (Figure 3.5 E). L'augmentation significative entre le jour 1 et le jour 2 de vie adulte est liée au fait qu'un plus grand nombre de vers voient leur soma déplacés, alors qu'il n'y a pas d'augmentation significative du défaut de type déplacement du neuropile (Figure 3.5 D-E). De plus, les défauts semblent progressifs puisqu'au deuxième jour de vie adulte, 45,9% des vers présentent les mêmes types de défauts (Figure 3.5 D).

### 3.2.3 La réduction de la fonction de *gon-1* modifie la distribution du collagène et de la laminine

Le gène *gon-1* code pour l'une des quatre ADAMTS de *C. elegans*. Le gène *mig-6*, qui code pour la papiline et qui présente des ressemblances avec les ADAMTS, joue un rôle dans la maintenance neuronale et dans la modification du collagène de type IV et la laminine (Nadour *et al.*; en préparation). Nous nous sommes donc demandé si la déplétion de *gon-1* pouvait aussi modifier le collagène de type IV et/ou la laminine  $\gamma$ . Le collagène IV a été visualisé à l'aide du rapporteur multicopie *qyIs46*, et la laminine  $\gamma$  à l'aide du rapporteur du locus de *lam-2* obtenue, par un CRISPR knock-in effectué dans le laboratoire du Dr Sherwood (Keeley *et al.*, 2020). Pour suivre la fluorescence, la région examinée et mesurée était en relation avec les structures neuronales étudiées, soit la région de la tête (du museau du ver jusqu'au bulbe terminal du pharynx). Il est à noter que les surfaces mesurées pour quantifier les fluorescences ne sont pas significativement différentes ni du contrôle EV, ni entre le jour 1 et le jour 2 de vie adulte. La quantification de la fluorescence du collagène de type IV a révélé une augmentation au premier jour de vie adulte par rapport au contrôle, de même pour la quantification de la laminine qui a présenté une augmentation de sa fluorescence au premier jour de vie adulte (Figures 3.6, 3.7). Seulement deux réplicats biologiques (avec un ou deux réplicats techniques) ont été effectués, car l'absence du gène *gon-1* entraîne une détérioration très rapide, dès le stade L4, des vers, diminuant ainsi le nombre de vers qui peuvent être quantifiés.

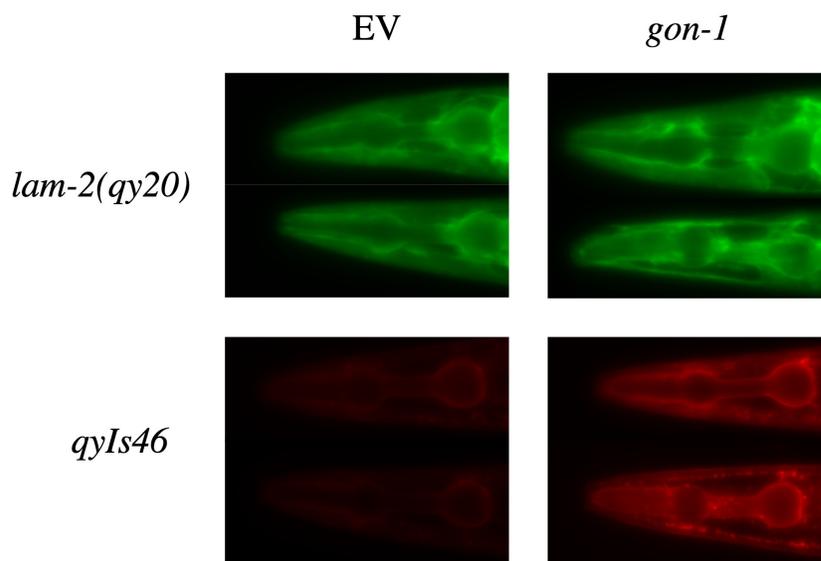
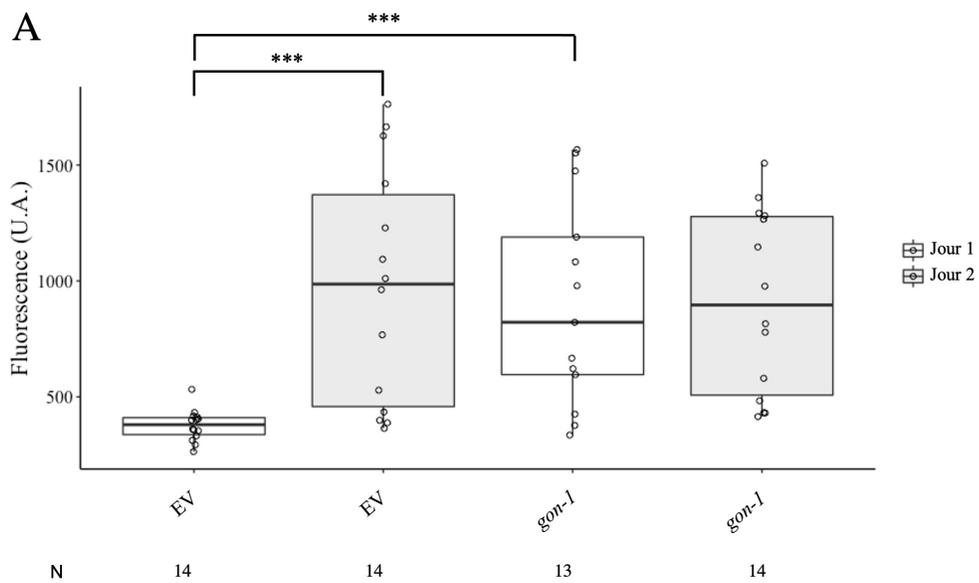


Figure 3.6 Fluorescence observée sur la souche *lam-2(qy20) qyIs46* suite à la déplétion du gène *gon-1*.



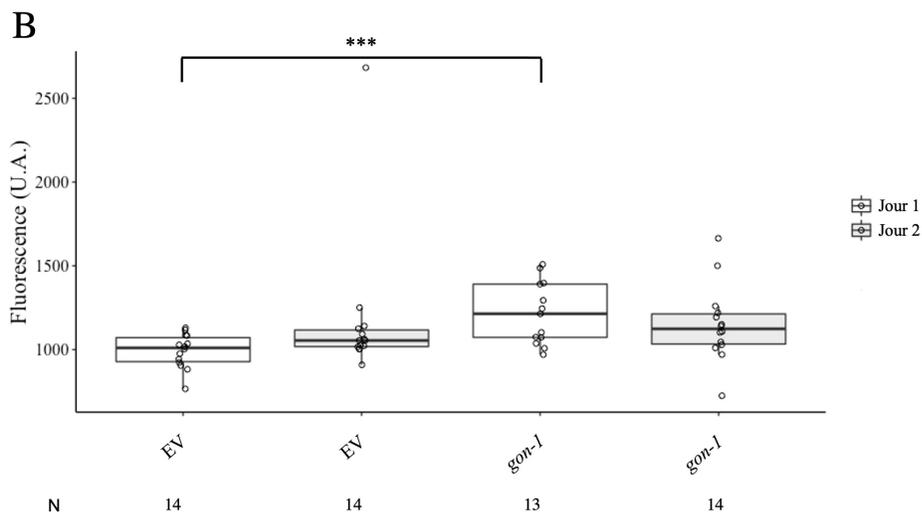


Figure 3.7 Expériences supplémentaires réalisées. Observation de la fluorescence du marqueur *qyIs46* au premier et au deuxième jour de vie adulte (A). Observation de la fluorescence du marqueur *lam-2(qy20)* au premier jour et au deuxième jour de vie adulte (B). \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . N= nombre d'individus observés.

### 3.2.4 La déplétion post-développementale de *mig-6* semble confirmer son implication dans la maintenance neuronale

Le gène *mig-6* est étudié dans notre laboratoire (Nadour *et al.*; en préparation). L'allèle isolé lors d'un crible génétique classique, nommé *qv33*, supprime efficacement les défauts des mutants *sax-7*. Cependant, cet allèle utilisé de *mig-6* est un allèle hypomorphe, c'est-à-dire que le gène code pour une protéine mutante présumée moins active que la protéine de type sauvage, et il n'y a pas d'absence totale du produit génique. De plus, une souche mutante représente une perte chronique de la fonction du gène. C'est pourquoi il était intéressant de dépléter le gène *mig-6* pendant la période larvaire et adulte, c'est-à-dire de façon post-développementale pour en analyser les conséquences sur la maintenance neuronale. La déplétion de *mig-6* par ARNi a entraîné un déplacement antérieur du neuropile par rapport au bulbe terminal du pharynx (Figure 3.3). Les défauts étaient déjà présents au premier jour de vie adulte, mais cela n'était pas significatif (Figure 3.5C), alors qu'au deuxième jour de vie adulte, 57,9%

des animaux présentait des défauts, comparé au contrôle, où seulement 3,4% des animaux montrent un déplacement (Figure 3.5C). Ce résultat est d'autant plus intéressant que les mutants *mig-6(qv33)* présentent très peu de défauts de maintien de l'organisation des ganglions de la tête. Il est donc possible que la déplétion aigüe de *mig-6* révèle d'autres aspects de sa fonction, ce qui pourrait permettre de mieux comprendre son rôle. Ces observations doivent être renforcées en commençant par la réplication afin de confirmer les résultats ainsi que d'effectuer l'ARNi de *mig-6* aux différents âges (larvaires et adultes) des animaux.

### 3.3 Le rôle de la matrice extracellulaire dans la distribution des synapses de la corde dorsale

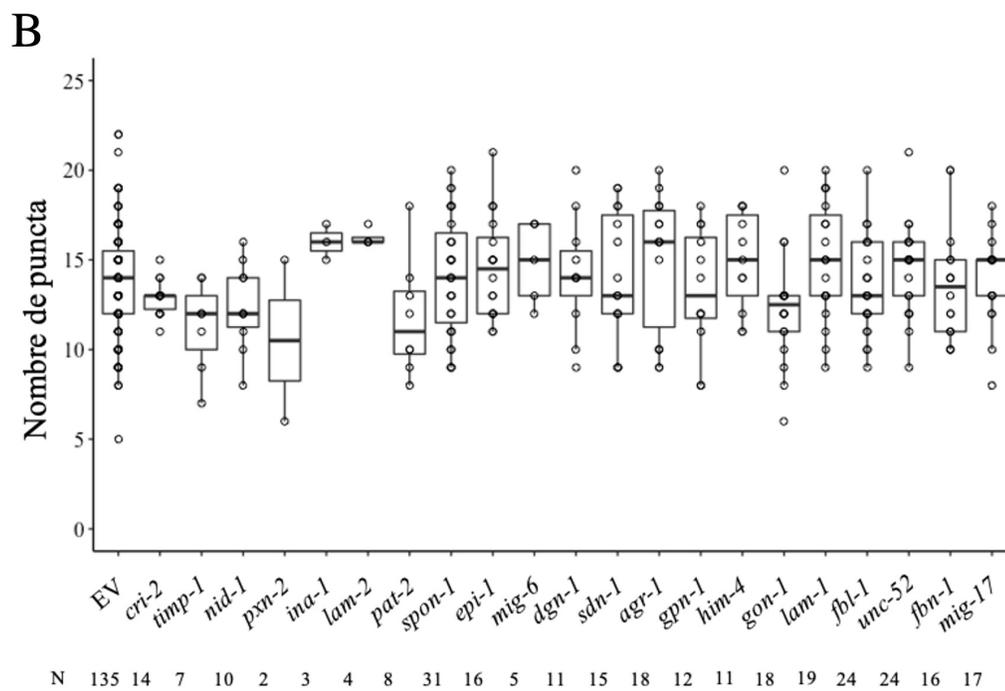
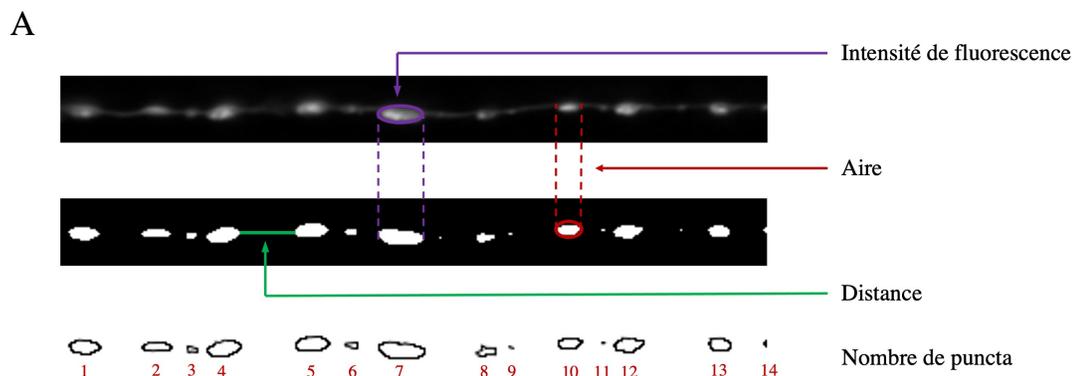
Similairement à l'étude du maintien de l'organisation des ganglions neuronaux de la tête, l'étude du maintien de la distribution des synapses de la corde nerveuse dorsale a été effectuée par un crible génétique par ARNi. Les 21 gènes sélectionnés, comme décrit plus haut, ont été déplétés un à la fois. Pour visualiser les spécialisations présynaptiques des neurones GABAergiques de la corde dorsale, le marqueur *juIs1*, dont le rapporteur est *unc-25p::snb-1::GFP*, a été utilisé. Un seul essai pour chacun des clones a été effectué pour l'observation de la corde dorsale avec 3 réplicats techniques. Les animaux ont été observés au stade jeune adulte, âge auquel les hermaphrodites ont entre 0 et 2 embryons maximum, ce qui facilite l'examen des synapses. Chaque animal a dû être positionné pour obtenir une vue dorsale (les vers sont naturellement sur leur côté, il a fallu les manipuler pour les placer correctement), afin de pouvoir être photographié pour effectuer des quantifications plus précises ultérieurement. Le nombre d'animaux étudié est moins important que dans l'étude des ganglions de la tête, qui pouvaient être évalués directement au microscope lors de l'observation des animaux.

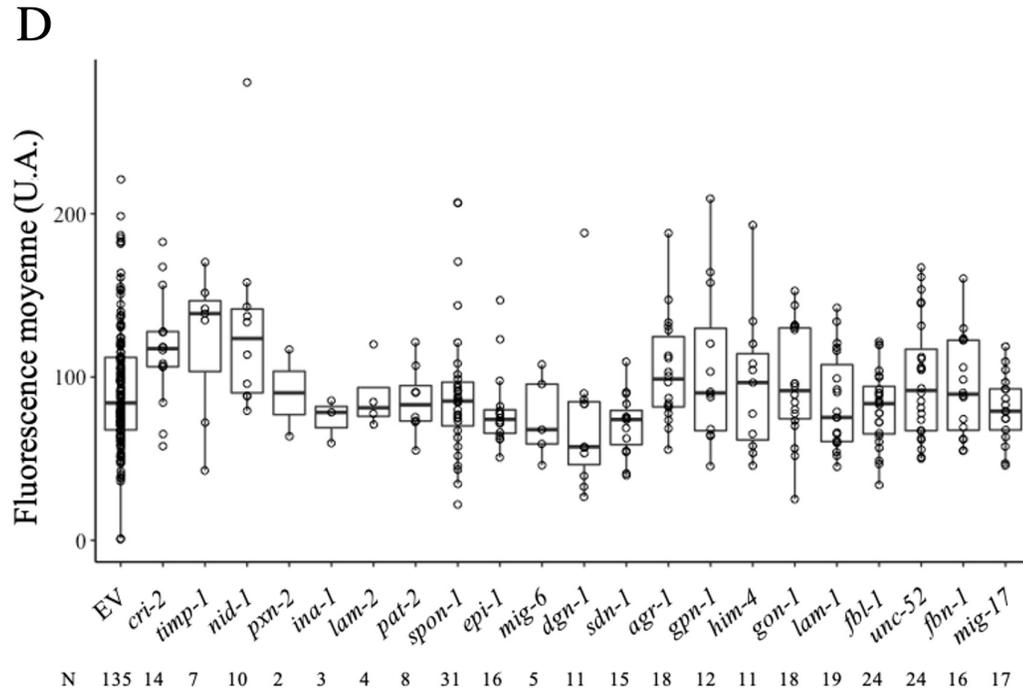
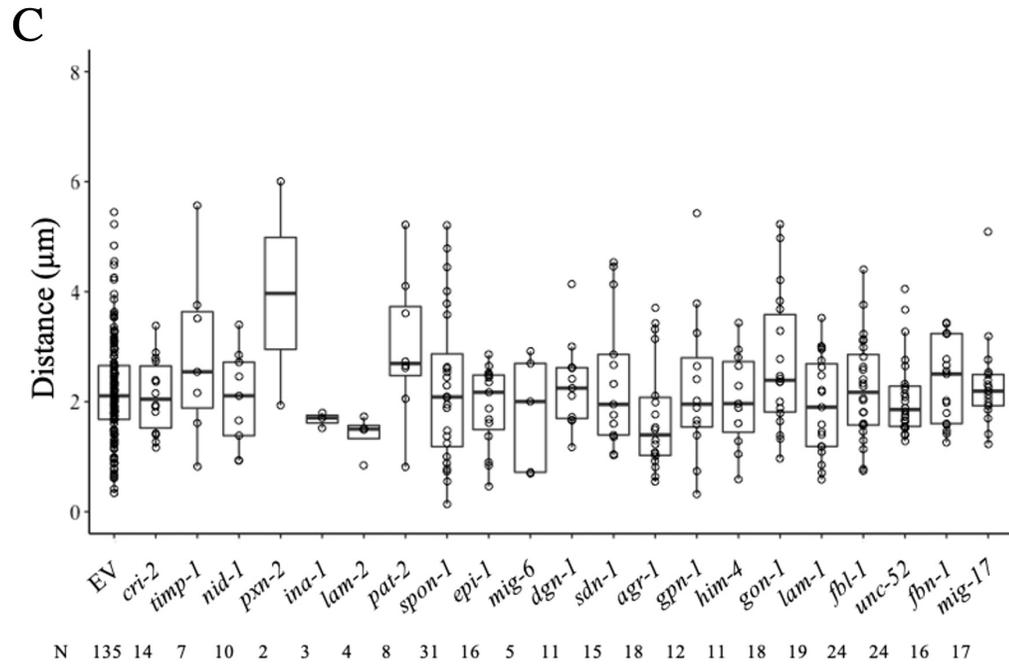
Pour quantifier de la distribution des synapses de la corde dorsale, une zone de 200  $\mu\text{m}$  située postérieure à la vulve a été photographiée en vue dorsale pour chacun des vers. Seule une portion de 50  $\mu\text{m}$  a été utilisée pour faire les quantifications, car des régions de la corde dorsale peuvent être hors focus. Les images correspondantes ont ensuite été utilisées afin d'étudier 4 paramètres concernant les puncta ou regroupements présynaptiques: (i) le nombre de puncta, (ii) l'aire moyenne des puncta, (iii) l'intensité de fluorescence moyenne des puncta et (iv) la distance moyenne entre les puncta (Figure 3.8A).

Pour permettre l'analyse des images, le bruit de fond a été retiré et un seuil de gris a été appliqué à chaque image de 50  $\mu\text{m}$ , à l'aide du logiciel ImageJ, afin de permettre la quantification des 4 paramètres précédemment indiqués. Les résultats des quantifications pour l'intensité de fluorescence et la surface des puncta n'a donné aucun résultat significatif pour les 21 gènes testés par ARNi comparé au contrôle EV (Figure 3.8 D-E). En revanche, la déplétion par ARNi de 3 gènes, soit *lam-2*, *ina-1* et *unc-52*, semble affecter le nombre de puncta et par le fait même de la distance moyenne entre eux (Figure 3.8 B-C). Les gènes *lam-2*(ARNi), *ina-1*(ARNi) et *unc-52*(ARNi) présentent un nombre plus important de puncta et une distance moyenne plus faible entre eux comparativement au contrôle. Toutefois, les tailles des échantillons sont malheureusement faibles (seulement 4 vers pour *lam-2* et 3 vers pour *ina-1* ont été observés) (Figure 3.9), et donc il sera important de refaire ces expériences sur un plus grand nombre de vers afin de confirmer ces résultats prometteurs.

Lors de la déplétion post-développementale de *unc-52*, un nombre plus important de puncta a été observé par rapport au contrôle avec une médiane de 15 pour *unc-52* et une de 13 pour le contrôle EV (Figure 3.9 A). De plus, puisqu'il y a plus de regroupements synaptiques, une distance entre les puncta plus faible, par rapport au contrôle, a été identifiée (Figure 3.9B). Un nombre plus important de vers devraient être

étudiés et deux réplicats biologiques devraient être réalisés afin de confirmer ces résultats.





E

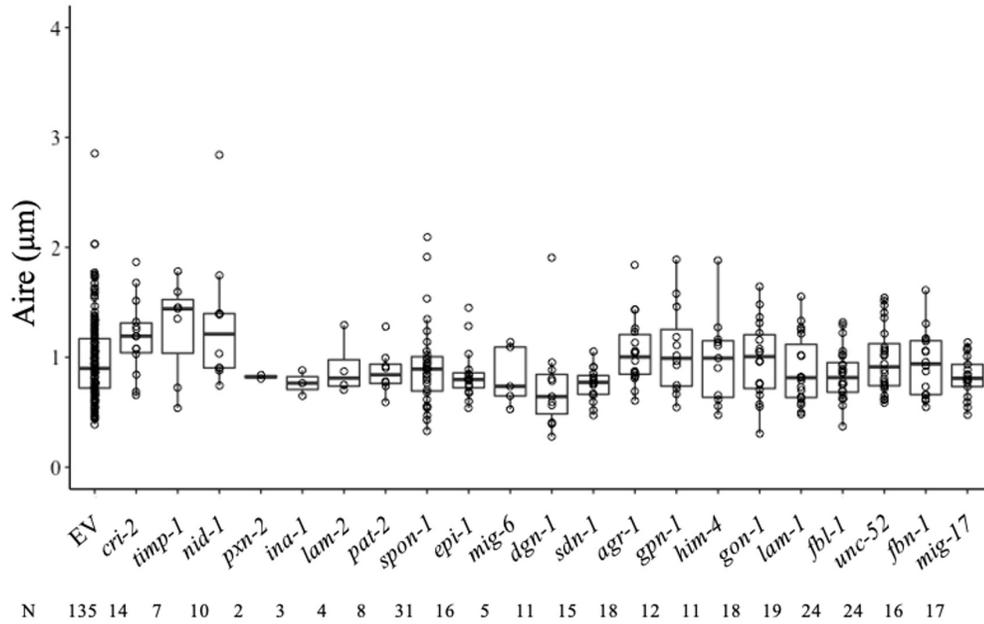
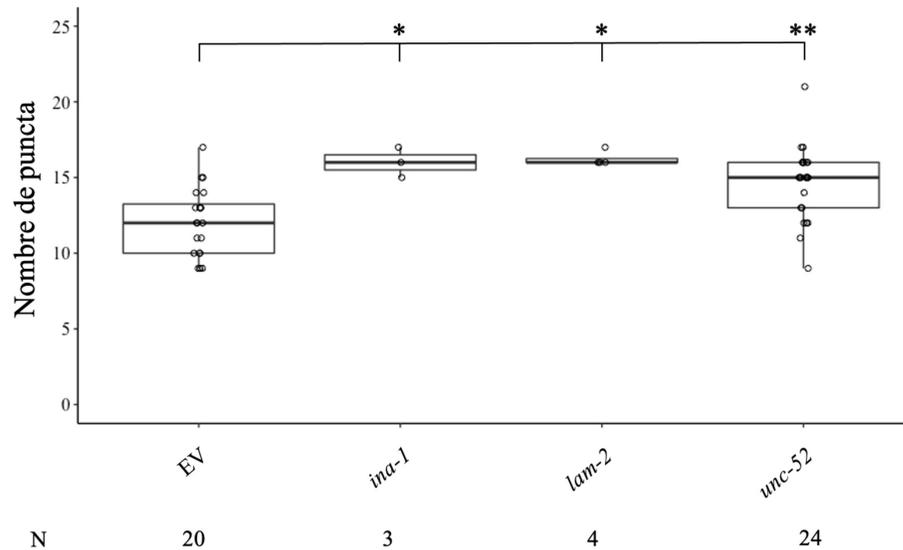


Figure 3.8 Quantifications des synapses de la corde dorsale sur une section de 50  $\mu\text{m}$ . Représentation schématique des 4 paramètres de quantification : le nombre de puncta (photo du bas), la distance entre les puncta (vert), l'intensité de fluorescence (violet) et l'aire des puncta (rouge) (A). Quantification du nombre de puncta (B). Quantification de la distance, en  $\mu\text{m}$ , entre les puncta (C). Quantification de la fluorescence moyenne des puncta (D). Quantification de l'aire moyenne des puncta en  $\mu\text{m}$  (E). N = nombre d'individus observé.

A



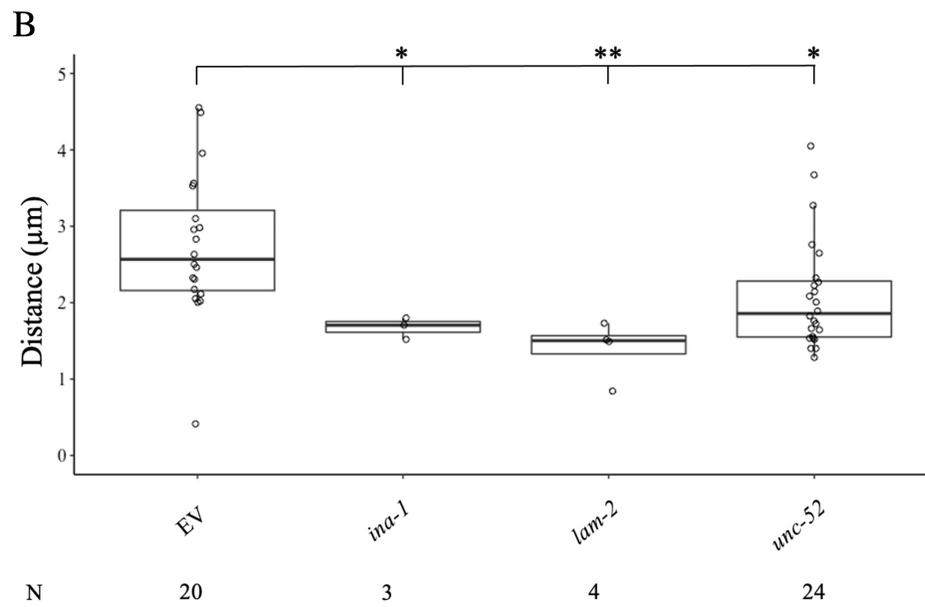


Figure 3.9 Quantifications du nombre de puncta (A) et de la distance entre les puncta (B). \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ . N = nombre d'individus.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Dans cette étude, le rôle de la matrice extracellulaire dans la maintenance à long terme de l'organisation du système nerveux a été étudié. Pour déterminer les conséquences de la perte de fonction post-développementale de chacun des 21 gènes codant pour des molécules de la matrice extracellulaire sur les structures neuronales, un crible de génétique inverse par ARNi a été effectué. Pour chacun de ces gènes, deux phénotypes neuronaux ont été examinés : l'organisation des ganglions de la tête et la distribution des synapses de la corde dorsale. Bien qu'au début du projet 42 gènes aient été envisagés, seuls 21 ont été testés pour les deux structures nerveuses (la *C. elegans RNAi Library* de McGill étant inaccessible due à la pandémie). Ainsi, dans de futurs travaux au laboratoire, il serait important de continuer ce crible de génétique inverse par ARNi avec des clones additionnels, tels que les gènes *adt-1*, *adt-2*, *adt-3* et les *zmp-1*, *zmp-2*, *zmp-3*, *zmp-4*, *zmp-5*, et *zmp-6*. Ces gènes codent pour des enzymes qui, comme *mig-6* et *gon-1*, modulent la matrice extracellulaire (Kelley *et al.*, 2019; Kuno *et al.*, 2002).

#### 4.1 Trois protéines supplémentaires impliquées dans la maintenance à long terme de l'organisation des ganglions de la tête chez *C. elegans*

Lors des observations effectuées sur le maintien de l'organisation des ganglions de la tête, après traitement par l'ARNi, trois gènes, *lam-2*, *gon-1* et *mig-6* ont montré un rôle potentiel dans la maintenance à long terme du système nerveux. Le gène *mig-6*

étant déjà intensivement étudié dans le laboratoire (et abordé dans l'Introduction), seuls les résultats concernant *lam-2* et *gon-1* seront discutés ci-dessous.

#### 4.1.1 Le rôle du gène *lam-2* dans la maintenance neuronale

##### 4.1.1.1 La laminine $\gamma$ affecte le positionnement du neuropile

Le rôle de la laminine est bien décrit lors de l'embryogenèse autant chez *C. elegans* que chez la drosophile et la souris. Elle jouerait un rôle important dans l'initialisation de l'assemblage de la matrice extracellulaire, ainsi que dans la migration cellulaire (Hohenester et Yurchenco, 2013; Jayadev et Sherwood, 2017). Cette glycoprotéine, deuxième plus abondante après le collagène, est constituée de quatre chaînes :  $\alpha A$ ,  $\alpha B$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  dont les gènes les codant sont respectivement *lam-3*, *epi-1*, *lam-1* et *lam-2* (Keeley *et al.*, 2020). Chez *C. elegans*, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  ont été étudiées dans le cadre du développement (Huang *et al.*, 2003; Kao *et al.*, 2006), alors qu'aucune étude, à ce jour, de la fonction de la sous-unité  $\gamma$  n'a été montrée ni lors du développement, ni dans le cadre de la maintenance neuronale. Tout comme la laminine  $\beta$ , la sous-unité  $\gamma$  n'est présente que sous une isoforme chez le ver, contrairement aux vertébrés, suggérant qu'elle a un rôle important dans toutes les fonctions de la laminine (Kao *et al.*, 2006).

Trois des quatre sous-unités ont été déplétées par ARNi : *epi-1*, *lam-1* et *lam-2* (le clone d'ARNi pour *lam-3* n'étant pas disponible). La déplétion des trois gènes testés a présenté un défaut similaire au niveau des ganglions de la tête, soit un déplacement postérieur du neuropile et des soma. Parmi ces trois gènes, seule la déplétion de la sous-unité  $\gamma$ , *lam-2*, a montré un effet robuste et reproductible avec des défauts significativement plus importants que le contrôle (EV). En effet, les défauts de déplacement postérieur ont été observés chez 3,4 % des animaux au jour 1 de vie adulte, chez 10,9% des vers au jour 2 et chez 35,4% des vers au jour 3 de vie adulte (Figure

3.5A). Il est donc nécessaire de mieux caractériser le rôle de *lam-2*, ainsi que d'identifier ses interacteurs dans le cadre de la maintenance neuronale.

Dans un premier temps, d'autres neurones qu'ASH et ASI pourraient être caractérisés au niveau des ganglions de la tête, en plus d'autres ganglions, afin d'évaluer l'ampleur de l'effet de la déplétion de *lam-2* sur une plus grande partie du système nerveux. Par exemple, des neurones tels que les interneurons AVK et AIY, situés dans le ganglion retrovésiculaire de la tête, ainsi que les neurones chimiosensoriels de types phasmides, PHA et PHB, situés dans les ganglions lombaires dans la queue du ver pourraient être examinés, comme décrit dans des études menées au laboratoire (Bénard *et al.*, 2009; Bénard *et al.*, 2006; Desse *et al.*, 2021; Pocock *et al.*, 2008). Les rapporteurs utilisés seraient *flp-1p::gfp* et *ttx-3p::rfp* pour AVK et AIY, et une coloration avec DiI pour les phasmides, permettant également de visualiser 6 amphides chimiosensoriels des ganglions de la tête. D'autres neurones se trouvant dans des structures neuronales distinctes pourraient aussi être étudiés grâce à la souche Neuropal, qui permet de visualiser les soma des 302 neurones simultanément, dû au marquage de chacune des 118 classes de neurone avec une couleur différente (voir Figure 1.5C; Yemini *et al.*, 2021).

Par ailleurs, lors de ce crible par ARNi, les vers ont été observés à l'âge adulte. Le gène *lam-2* pourrait aussi être déplété à d'autres stades, tels que le 4<sup>e</sup> stade larvaire ou au stade jeune adulte, afin de déterminer si des défauts peuvent apparaître chez des adultes de 3 à 10 jours suite à cette déplétion tardive de la fonction du gène. Cela indiquerait un rôle soutenu de *lam-2* durant l'âge adulte. De plus, pour visualiser de façon simultanée la distribution de *lam-2* et les neurones ASH et ASI, une nouvelle souche devrait être construite. Pour ce faire, le rapporteur *sra-6p::DsRed2* devrait être intégré dans le génome du ver (j'ai effectué deux tentatives sans succès, bien que j'aie pu intégrer d'autres rapporteurs). En effet, la souche utilisée dans ce mémoire est *hdlIs26*

qui contient le rapporteur *sra-6p::DsRed2* qui est fluorescent dans le rouge et *odr-2p::CFP* qui est fluorescent dans le vert. Or, le rapporteur *lam-2(qy20)[lam-2::mNG](Keeley et al., 2020)*, que l'on nommera simplement *lam-2(qy20)*, est, lui aussi, fluorescent dans le vert. La fluorescence du rapporteur *odr-2p::CFP* vient ainsi masquer celle de *lam-2(qy20)* au niveau de la tête, d'où la nécessité d'intégrer uniquement *sra-6p::DsRed2* dans des vers de type sauvage afin de construire la souche *sra-6p::DsRed2; lam-2(qy20)* permettant d'observer simultanément les neurones ASH et ASI et la distribution de la laminine  $\gamma$ .

4.1.1.2 Connaître la distribution spatio-temporelle de la laminine  $\gamma$  pour mieux comprendre son rôle dans la maintenance neuronale

De récentes études ont montré que le gène *lam-2* était principalement exprimé au niveau des muscles de la paroi corporelle et de la « distal tip cell » (DTC, une cellule somatique qui influence le développement de la gonade et maintient l'état prolifératif dans la lignée germinale) (Cao *et al.*, 2017; Hutter et Suh, 2016). Toutefois, la laminine, comme d'autres protéines de la matrice, est une protéine sécrétée (Yurchenco, 2015) et sa distribution extracellulaire n'est pas homogène au sein des différentes matrices extracellulaires (Kramer, 2005). Ces variations de distribution peuvent influencer ses rôles dans différents contextes, et par conséquent l'apparition ou non de défauts suite à sa déplétion par ARNi. Ainsi, le lieu où *lam-2* est spécifiquement exprimé, afin de permettre le maintien du système nerveux, devrait être identifié. Pour déterminer le tissu où son expression est nécessaire pour la maintenance neuronale, la déplétion du gène *lam-2* pourrait être faite grâce à l'ARNi tissu-spécifique (ARNi-TS). Cette approche permet de dépléter le transcrite codant pour la protéine dans un seul tissu grâce à l'utilisation d'un promoteur spécifique qui assure l'expression d'ARNdb dans des cellules précises.

Deux approches permettent d'effectuer l'ARNi-TS. La première consiste à effectuer l'ARNi du gène d'intérêt sur des mutants *sid-1(0)* où l'absence de SID-1 empêche l'importation, par la cellule, des ARNdb. Ainsi, cela prévient l'ARNi systématique en empêchant le transfert des ARNdb de cellule en cellule. En exprimant une copie *sid-1(+)* sous un promoteur tissu-spécifique dans un tissu particulier, le gène d'intérêt pourrait être déplété uniquement dans le tissu exprimant la copie sauvage de SID-1 (Hunter *et al.*, 2006; Whangbo *et al.*, 2017).

Dans la même optique, des mutants pour le gène *rde-1* pourraient être utilisés pour faire l'ARNi-TS, puisque ceux-ci sont résistants à l'ARNi. Ainsi, l'expression d'une copie sauvage *rde-1(+)* dans un tissu spécifique permet de restaurer l'effet de l'ARNi et ainsi dépléter le gène d'intérêt dans le tissu sélectionné (Qadota *et al.*, 2007). Par exemple, si la déplétion de *lam-2* via l'ARNi est effectuée uniquement dans le tissu musculaire, avec le promoteur *myo-3p*, et qu'aucun défaut n'apparaît au niveau du neuropile, alors on pourrait conclure que l'expression de *lam-2* à partir des muscles ne semble pas être requise pour la maintenance neuronale des ganglions antérieurs. D'autres promoteurs spécifiques pourraient alors être utilisés tels que *dpy-7p* pour les cellules épidermales constituant un syncytium appelé hyp7 situé au niveau de ganglions de la tête, ou bien *hlh-17p* pour les cellules gliales de type CEPsh qui entourent le neuropile, ou encore *nep-2p* pour les cellules gliales de type GLR qui tapissent l'intérieur du neuropile (Fung *et al.*, 2020; Gilleard *et al.*, 1997; Meng *et al.*, 2016; Yamada *et al.*, 2010).

De plus, l'utilisation de la photoconversion permettrait de mettre en évidence la dynamique spatio-temporelle de *lam-2*. En effet, la protéine Dendra, lorsqu'elle est excitée par un laser à 405 nm, passe du vert au rouge (Gurskaya *et al.*, 2006; Ihara *et al.*, 2011). La création d'une souche portant le transgène *lam-2p::lam-2::Dendra2* serait nécessaire pour effectuer le suivi de la laminine  $\gamma$ . Pour ce faire, un plasmide, préalablement construit contenant *lam-2p::lam-2::Dendra2*, serait injecté dans des

vers pour générer un réseau extrachromosomale contenant des copies multiples du plasmide (Mello *et al.*, 1991). Une fois une lignée obtenue, *lam-2p::lam-2::Dendra2* serait intégré, par irradiation et sélection, au génome du ver (Mariol *et al.*, 2013). L'intégrant obtenu, les vers seraient croisés plusieurs fois avec la souche sauvage N2, afin d'enlever les mutations. Cette souche serait alors utilisée pour faire la photoconversion qui rend ainsi possible le suivi de la localisation des protéines photoconverties. Un protocole similaire à celui précédemment décrit (Ihara *et al.*, 2011) serait utilisé, ayant déjà fonctionné avec les protéines de la matrice extracellulaire, lors des travaux de ce groupe. Des zones telles que le pharynx et le neuropile pourraient être visées pour étudier la dynamique de LAM-2 dans la région de la tête.

#### 4.1.1.3 Identifier les partenaires de *lam-2* dans la maintenance neuronale

Comme mentionné, la laminine est une protéine composée de différentes sous-unités. Ainsi, une double déplétion, par ARNi, de deux sous-unités de la laminine, *lam-1* et *lam-2*, a été effectuée dans le but de tester si leur absence entraînerait une augmentation des défauts (Figure 3.5B). Or, une absence de défauts a été constatée. Cette absence de défauts lors de la double ARNi pourrait être due à une inhibition. En effet, il est connu que mélanger deux clones bactériens, dont les plasmides sont différents, peut atténuer la déplétion des deux gènes (Ahringer, 2006; Gouda *et al.*, 2010; Qadota *et al.*, 2008). Il semble donc que l'absence de défauts soit due à une inhibition de la déplétion de ces gènes. Pour pouvoir observer les effets de la déplétion des deux sous-unités et contrer l'inhibition, un seul plasmide devrait être construit avec les deux gènes insérés côte à côte entre les promoteurs de l'ARN polymérase T7, comme décrit (Gouda *et al.*, 2010). Ainsi, l'ARNi avec la déplétion simultanée de *lam-2* et *lam-1* peut être réalisée. Une augmentation des défauts, telle qu'attendu en l'absence de 2 des 4 sous-unités de la laminine, pourrait ainsi être induite et permettrait de mieux évaluer son importance

dans la maintenance neuronale. Dans cette optique, l'utilisation d'un seul plasmide aiderait à identifier les partenaires de *lam-2*, tels qu'*epi-1* et *lam-3* dans le contexte de la maintenance neuronale.

D'autres interacteurs de *lam-2* pourraient être identifiés grâce aux travaux actuellement réalisés au laboratoire. En effet, ceux-ci ont montré qu'une mutation dans le gène MIG-6/Papiline entraîne une densification du collagène ce qui a pour effet d'empêcher les neurones des mutants *sax-7* de se désorganiser chez l'adulte (Nadour *et al.*, en préparation). Une modification de la laminine  $\beta$  a aussi été observée. Nous nous sommes donc demandé si *mig-6* pouvait aussi agir sur la laminine  $\gamma$ . Pour ce faire, des souches contenant soit le mutant *sax-7(qv30)* soit le mutant *mig-6(qv33)* ont été construites avec les marqueurs *lam-2(qy20)* et *qyIs46(emb-9::mCherry)* pour visualiser simultanément la laminine  $\gamma$  et le collagène de type IV. J'ai initié la construction de la souche *sax-7(qv30); mig-6(qv33); lam-2(qy20) qyIs46*, qui est toujours en cours et qui sera complétée par l'équipe du laboratoire. Les souches pourront éventuellement être observées pour examiner les effets de ces mutations sur la distribution de *lam-2* et potentiellement révéler des informations sur son rôle.

D'autres approches telles que l'Auxin-inducible degradation (AID) pourraient être envisagées pour trouver de nouveaux partenaires d'interaction. Dans le cas de l'AID, la protéine ciblée est dégradée, de façon contrôlée dans le temps et selon le type de cellule, par le protéasome. Celle-ci doit avoir au moins un domaine intracellulaire pour être dégradée (Zhang *et al.*, 2015). Comme la plupart des protéines de la matrice extracellulaire sont sécrétées, cette approche ne pouvait pas être utilisée pour effectuer notre crible. Toutefois, elle serait avantageuse pour mettre en évidence les interacteurs de LAM-2 tels que les sous-unités de l'intégrine. L'interaction entre ces deux protéines est bien connue dans le contexte du développement et de la migration cellulaire (Jayadev et Sherwood, 2017; Yamada et Sekiguchi, 2015; Yurchenco, 2015). En

revanche, elles ne sont pas connues dans le contexte de la maintenance neuronale. La dégradation, par AID, des intégrines spécifiquement au niveau des neurones, où elles sont exprimées, pourrait être réalisée soit dans des mutants viables de perte de fonction partielle de *lam-2*, soit en combinaison avec l'ARNi de *lam-2*, afin de déterminer quelles sous-unités de l'intégrine sont importantes dans la maintenance neuronale.

#### 4.1.1.4 La perte de maintenance pourrait entraîner un vieillissement prématuré

Finale­ment, dans le cadre de ces travaux, il a été montré que *lam-2* joue un rôle important dans la maintenance neuronale à long terme, puisque son absence entraîne des défauts de maintenance qui sont progressifs entre le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>e</sup> jour de vie adulte (Figure 3.5A). Le déplacement postérieur du neuropile et des soma observé en l'absence de cette sous-unité est un phénotype qui ressemble à celui observé chez les vers de type sauvage âgés de 10 jours (Khandekar, 2015). Ce déplacement des neurones observé en l'absence du gène *lam-2* suggère une perte de la maintenance neuronale et donc possiblement un vieillissement prématuré. En effet, des défauts de maintenance progressifs pourraient être reliés à un vieillissement plus rapide du système nerveux (Bénard et Hobert, 2009). Il serait ainsi intéressant d'étudier les effets à long terme de la perte de *lam-2* au niveau fonctionnel. Une étude a montré qu'avec l'âge le transport du calcium diminuait dans le neurone ASH chez le type sauvage (Chokshi *et al.*, 2010). L'utilisation de technique d'imagerie du calcium pourrait permettre de voir si l'absence de *lam-2* produit une diminution du transport de calcium tel qu'observé chez les vers âgés de type sauvage et ainsi confirmer l'hypothèse d'un vieillissement prématuré du système nerveux.

En revanche, l'ARNi de *lam-2* effectuée au stade L1 ne pourrait pas être utilisée pour regarder des vers âgés puisque cela entraîne une paralysie dès le 3<sup>e</sup> jour de vie adulte. Dans le but d'observer les effets à long terme de la perte de la laminine  $\gamma$ , ainsi que

pour mieux étudier ses interactions, les 37 allèles de *lam-2* créés lors du « Million mutation project » (Thompson *et al.*, 2013) pourraient être testés pour voir si l'une d'entre elles serait viable afin de l'utiliser pour étudier la maintenance neuronale. Si aucun de ces allèles n'est viable, deux approches pourraient être envisagées : effectuer l'ARNi *lam-2* sur des vers au stade L4 ou jeune adulte afin d'observer ses effets à un âge plus avancé. Ou créer une souche, avec la même procédure que pour la souche avec Dendra (§ 4.1.1.2), mais qui possède une mutation sensible à la température. Celle-ci pourrait être utilisée pour induire la déplétion de *lam-2* uniquement après le développement du système nerveux.

#### 4.1.2 Le rôle de l'ADAMTS GON-1 dans la maintenance neuronale

La protéine GON-1, orthologue des ADAMTS 9 et 20, est une protéase qui module la composition de la matrice et qui facilite notamment la formation des synapses des bras musculaires avec les axones des motoneurones. Alors qu'après le développement des synapses, GON-1 empêcherait leur croissance (Kurshan *et al.*, 2014). Ainsi, GON-1 joue donc un rôle dans le développement du système nerveux.

##### 4.1.2.1 Observer d'autres neurones et identifier la distribution spatio-temporelle de GON-1

Dans le cadre de notre étude sur la maintenance post-développementale de l'organisation du système nerveux, les résultats montrent qu'au 1<sup>er</sup> jour de vie adulte 19,1% des vers ayant été soumis à la déplétion post-développementale de *gon-1* ont présenté soit un déplacement des soma soit un déplacement postérieur du neuropile. Ces défauts ont aussi été observés chez 45,9% des vers au 2<sup>e</sup> jour de vie adulte (Figure 3.5D-E). Pour aller plus loin dans l'analyse des effets de la déplétion de *gon-1*, d'autres neurones (AVK, AIY, PHA et PHB) pourraient être étudiés tel que décrit (§ 4.1.1.1).

De plus, seuls des animaux aux deux premiers jours de vie adulte ont été examinés. La déplétion de *gon-1* pourrait être effectuée à d'autres stades (larvaires et adultes) afin de déterminer si les défauts sont présents à un plus jeune âge et s'ils continuent à être progressifs à l'âge adulte. En parallèle, une souche, contenant le rapporteur *gon-1::mNG*, ainsi que le rapporteur *sra-6p::DsRed2* (§4.1.1.1) pourrait être construite afin de quantifier la distribution et la dynamique de GON-1 aux différents stades, et ce parallèlement à l'observation des défauts des ganglions de la tête. Une autre souche, *gon-1p::gon-1::Dendra2*, pourrait être construite pour mieux évaluer la dynamique et la distribution spatio-temporelle de GON-1, tel que décrit (§4.1.1.2).

De plus, tel qu'indiqué précédemment, l'expression des protéines de la matrice extracellulaire varie selon les tissus et l'âge et n'est donc pas homogène (§ 4.1.1.2). L'expression de *gon-1* ne fait pas exception. Il est connu que *gon-1* est exprimé principalement au niveau de la gonade lors du développement (Blelloch *et al.*, 1999; Blelloch et Kimble, 1999), ainsi que dans les canaux associés aux neurones et dans les neurones GABAergiques (Hutter et Suh, 2016). Toutefois, l'expression de GON-1 n'est pas connue dans le contexte de la maintenance neuronale. Ainsi, l'ARNi-TS pourrait aussi être utilisée afin de connaître le tissu où *gon-1* doit être exprimé pour permettre la maintenance des neurones des ganglions de la tête (§4.1.1.2). Cette ARNi-TS pourrait être réalisée à différents stades de croissance du ver afin de confirmer la distribution spatio-temporelle de cette ADAMTS.

#### 4.1.2.2 Connaître les interacteurs de GON-1 dans la maintenance neuronale

Des interacteurs de GON-1 dans le cadre de la maintenance neuronale devraient être recherchés afin de mieux comprendre son rôle dans ce contexte. Une autre ADAMTS, MIG-17, est connue dans le contexte de la maintenance neuronale où elle agirait dans la même voie de signalisation que la protéine MIG-6/Papiline pour réguler EMB-

9/collagène de type IV. L'absence de MIG-17 entraîne une densification ou une réorganisation de EMB-9 (Nadour *et al.*, en préparation). Puisque l'absence d'une ADAMTS, telle que MIG-17, modifie la composition de la matrice extracellulaire, nous nous sommes demandé si l'absence de GON-1 entraînait aussi une modulation des composants de la matrice. Dans le but d'évaluer cette hypothèse, une expérience complémentaire avec la déplétion de *gon-1*(ARNi) a été effectuée sur la souche *lam-2(qy20) qyIs46* afin d'observer la distribution de LAM-2 et de EMB-9. Dans un premier temps, l'ARNi *gon-1* devrait être faite une nouvelle fois pour avoir 3 réplicats biologiques et plus d'animaux. Pour les deux protéines, une augmentation de la fluorescence, par rapport au contrôle EV, a été observée au 1<sup>er</sup> jour de vie adulte, alors qu'elle n'est pas significative 2<sup>e</sup> jour de vie adulte (Figures 3.6 et 3.7). Il serait intéressant d'observer la déplétion de *gon-1* sur des vers au 4<sup>e</sup> stade larvaire afin de voir si l'accumulation commence à un plus jeune âge. Les résultats obtenus ici concordent avec une étude qui a mis en évidence le rôle de GON-1 dans la dégradation de EMB-9 au niveau de la gonade (Kubota *et al.*, 2012). Les auteurs de cet article ont aussi déterminé un rôle antagoniste de FBL-1/fibuline dans le maintien des niveaux de EMB-9 (Kubota *et al.*, 2012). D'ailleurs, dans le contexte de la formation des synapses, l'action de GON-1 et de FBL-1 sur EMB-9 a été identifiée (Kurshan *et al.*, 2014). Ainsi, il pourrait être intéressant d'évaluer le rôle antagoniste de FBL-1 au niveau des ganglions de la tête dans le cadre de la maintenance neuronale, en effectuant l'ARNi de *gon-1* sur des mutants *fbl-1*.

En plus de l'ARNi, des mutants hétérozygotes pour *gon-1*, tel que *gon-1(q518)/ nT1* (Blelloch *et al.*, 1999; Blelloch et Kimble, 1999), qui est moins létal que les homozygotes, pourrait être utilisé pour déterminer d'autres interacteurs de *gon-1*. Cette souche pourrait être combinée avec de nombreuses autres que nous possédons au laboratoire pour déterminer les différentes interactions génétiques de *gon-1*. Dans un premier temps, un double mutant *gon-1* et *mig-17* portant les marqueurs *lam-2(qy20)*

*qyls46* pourrait être construit afin de tester si l'absence des deux ADAMTS modifie la distribution de LAM-2 et de EMB-9. Tel qu'indiqué précédemment, MIG-17 entraîne une densification du collagène de type IV (Nadour *et al.*; en préparation), ainsi supprimer ces deux ADAMTS pourrait nous permettre de voir si les deux protéines agissent dans la même voie de signalisation.

De plus, le type de défaut observé en majorité était un déplacement antérieur des soma des neurones, tel qu'observé chez les mutants *sax-7(qv30)* (Desse *et al.*, 2021). Des études du laboratoire ont montré que ces défauts sont supprimés en l'absence d'une autre protéine régulatrice : MIG-6/Papiline (Nadour *et al.*; en préparation). L'hypothèse envisagée est que l'absence de MIG-6, comme celle de MIG-17, entraîne un remodelage de la matrice (dont la densification du collagène de type IV est une évidence), permettant ainsi de maintenir les soma des neurones en position postérieure au neuropile (Nadour *et al.*; en préparation). La création d'un triple mutant *sax-7(qv30) gon-1(q518)/nT1; mig-6(qv33); qyls46* (en plus des simples et des doubles mutants comme contrôles) permettrait de voir si *gon-1* joue un rôle redondant avec *mig-6* pour maintenir les soma en place. En cas d'impossibilité de créer le triple mutant, à cause de la courte distance (moins de 1 cM) entre *sax-7* et *gon-1*, l'ARNi de *gon-1* pourrait être réalisée sur des doubles mutants *sax-7; mig-6* déjà présents au laboratoire.

#### 4.2 Trois gènes pourraient jouer un rôle dans la maintenance de l'organisation synaptique

Dans la même optique que pour les ganglions de la tête, la déplétion par ARNi de *unc-52*, *lam-2* et *ina-1* a permis d'observer la présence de défauts au niveau des synapses de la corde dorsale et plus précisément une augmentation du nombre de puncta, par rapport au contrôle EV, et symétriquement une diminution de la distance entre les puncta (Figure 3.9). Un seul réplicat a été effectué pour chacun des gènes, il est donc

nécessaire d'en augmenter le nombre (pour en avoir 3) et le nombre de vers observés afin de confirmer les résultats. Après avoir reproduit ces résultats, une stratégie similaire à celle employée pour *lam-2* (§4.1.1) et *gon-1* (§4.1.2) pourrait être appliquée. Ainsi, la distribution spatio-temporelle pourrait être étudiée à l'aide de souches construites avec la protéine Dendra2, respectivement *ina-1p::ina-1::Dendra2* et *unc-52p::unc-52::Dendra2* (celle avec LAM-2 étant déjà proposée; §4.1.1.2). De plus, l'ARNi-TS permettrait de déterminer le tissu où l'expression des protéines, telles que UNC-52, est nécessaire pour la maintenance synaptique (§4.1.1.2). Puis, les interacteurs essentiels de ces protéines dans le contexte de la maintenance synaptique devraient être recherchés. Par exemple, la protéine UNC-52 est un antagoniste de GON-1 et de EMB-9 dans le contexte de la croissance des boutons synaptiques (Qin *et al.*, 2014). Ces interactions pourraient ainsi être évaluées avec l'utilisation de mutants ou avec la déplétion par ARNi.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus dans ce travail ont permis d'établir une première étude systématique du rôle de la matrice extracellulaire dans la maintenance de l'organisation neuronale et synaptique, et ce, toutes espèces confondues. Ainsi, le crible génétique par ARNi effectué ici, a permis de révéler de nouvelles protéines, LAM-2 et GON-1, qui jouent un rôle important dans la maintenance neuronale, ainsi que d'éventuelles protéines, UNC-52/Perlecan, LAM-2/Laminine  $\gamma$  et INA-1/Intégrine  $\alpha$  dans la maintenance synaptique au niveau de la corde dorsale. Ces informations obtenues pourraient éventuellement permettre de mettre en évidence des phénotypes neuronaux chez l'humain contribuant au diagnostic et au traitement de maladies liées à la matrice extracellulaire, ainsi que des maladies dégénératives qui demeurent actuellement non cataloguées. En effet, la conservation des gènes entre l'humain et *C. elegans* est si importante, qu'environ 70% des gènes liés à des maladies humaines ont des homologues chez le ver. De plus, les mécanismes de développement et de vieillissement sont hautement conservés du ver à l'humain.

Notre étude pourrait aussi permettre de mieux comprendre des maladies liées au système nerveux. En effet, une mutation dans le gène de l'agrine (AGR-1 chez *C. elegans*) a été identifiée comme jouant un rôle dans le développement du Syndrome myasthénique congénital, causant un défaut de maintenance développementale des spécialisations post-synaptiques et se caractérisant par une faiblesse et une fatigue musculaire progressive (Huzé *et al.*, 2009). Toujours dans le contexte des maladies liées au système nerveux, la matrice extracellulaire peut aussi être impliquée dans des maladies dites neurodégénératives. C'est le cas de la MMP-10, une métalloprotéinase matricielle (MMP), qui est impliquée dans la protéolyse de la huntingtine et où elle

modulerait l'accumulation neuronale de ses résidus dans la maladie de Huntington (Miller *et al.*, 2010).

De plus, cette étude pourrait éventuellement permettre de mieux comprendre de nombreuses maladies liées aux gènes de la matrice. Par exemple, des mutations dans la fibrilline, dont l'orthologue chez le ver est FBN-1, sont responsables du syndrome de Marfan. Celui-ci cause des défauts au niveau des tissus conjonctifs affectant les systèmes cardiaques et oculaires ainsi que le squelette (Judge et Dietz, 2005; Sakai *et al.*, 2016). Un autre exemple de maladie où la matrice est impliquée est le diabète de type II, où l'absence de GON-1 viendrait influencer la voie de signalisation de l'insuline causant potentiellement une résistance (Yoshina et Mitani, 2015; Zeggini *et al.*, 2008).

Ainsi, l'étude de cette matrice extracellulaire dans le contexte du système nerveux est essentielle pour mieux comprendre son rôle dans de nombreuses maladies qui lui sont liées. Or, son rôle dans les mécanismes de maintenance neuronale et synaptique est peu connu, alors que des anomalies dans les filets périneuronaux, une matrice extracellulaire spécialisée au niveau cerveau, sont connues pour entraîner des troubles de la mémoire chez les souris (Cope *et al.*, 2021). Une autre étude, chez des patients qui étaient atteints de la sclérose en plaque, a mis en évidence un lien entre la démyélinisation des axones au niveau du cortex cérébral et l'augmentation de l'activité de la MMP-9 en plus de la dégradation des filets périneuronaux (Gray *et al.*, 2008).

Finalement, très peu d'études ont été réalisées sur le rôle de la matrice extracellulaire dans la maintenance neuronale et synaptique. Ainsi, réaliser des études systématiques, telle que celle-ci, aidera à mieux comprendre les maladies humaines liées au système nerveux et à la matrice extracellulaire. Contribuant à affiner le diagnostic de troubles dégénératifs rares n'ayant pas de causes avérées à ce jour.

## BIBLIOGRAPHIE

- Ahringer J (2006) Reverse genetics. *WormBook* doi/10.1895/wormbook.1.47.1.
- Andersen J, Krichevsky A, Leheste JR et Moloney DJ (2008) *Caenorhabditis elegans* as an undergraduate educational tool for teaching RNAi. *Biochemistry and molecular biology education* 36: 417-427.
- Aurelio O, Hall DH et Hobert O (2002) Immunoglobulin-domain proteins required for maintenance of ventral nerve cord organization. *Science* 295: 686-690.
- Bénard C et Hobert O (2009) Looking beyond development: maintaining nervous system architecture. *Current topics in developmental biology* 87: 175-194.
- Bénard C, Tjoe N, Boulin T, Recio J et Hobert O (2009) The small, secreted immunoglobulin protein ZIG-3 maintains axon position in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 183: 917-927.
- Bénard CY, Blanchette C, Recio J et Hobert O (2012) The secreted immunoglobulin domain proteins ZIG-5 and ZIG-8 cooperate with L1CAM/SAX-7 to maintain nervous system integrity. *PLoS genetics* 8: e1002819.
- Bénard CY, Boyanov A, Hall DH et Hobert O (2006) DIG-1, a novel giant protein, non-autonomously mediates maintenance of nervous system architecture. *Development* 133: 3329-3340.
- Blelloch R, Anna-Arriola SS, Gao D, Li Y, Hodgkin J et Kimble J (1999) The gon-1 gene is required for gonadal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 216: 382-393.
- Blelloch R et Kimble J (1999) Control of organ shape by a secreted metalloprotease in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 399: 586-590.
- Bonnans C, Chou J et Werb Z (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 15: 786-801.
- Boulin T, Etchberger JF et Hobert O (2006) Reporter gene fusions. *WormBook* 1-23 10.1895/wormbook.1.106.1.
- Brenner S (1973) The genetics of behaviour. *British medical bulletin* 29: 269-271.

- Brenner S (1974) The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77 (1): 71-94.
- Bülow HE, Boulin T et Hobert O (2004) Differential functions of the *C. elegans* FGF receptor in axon outgrowth and maintenance of axon position. *Neuron* 42: 367-374.
- Byerly L, Cassada RC et Russell RL (1976) The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental biology* 51: 23-33.
- Cao J, Packer JS, Ramani V, Cusanovich DA, Huynh C, Daza R, Qiu X, Lee C, Furlan SN, Steemers FJ, et al. (2017) Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism. *Science* 357: 661-667.
- Cassada RC et Russell RL (1975) The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 46: 326-342.
- Chalfie M (2009) GFP: Lighting up life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 10073-10080.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW et Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
- Cherra SJ, 3rd et Jin Y (2016) A Two-Immunoglobulin-Domain Transmembrane Protein Mediates an Epidermal-Neuronal Interaction to Maintain Synapse Density. *Neuron* 89: 325-336.
- Chokshi TV, Bazopoulou D et Chronis N (2010) An automated microfluidic platform for calcium imaging of chemosensory neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Lab on a chip* 10: 2758-2763.
- Consortium TCeS (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282: 2012-2018.
- Cope EC, Zych AD, Katchur NJ, Waters RC, Laham BJ, Diethorn EJ, Park CY, Meara WR et Gould E (2021) Atypical perineuronal nets in the CA2 region interfere with social memory in a mouse model of social dysfunction. *Molecular psychiatry* .

- Corsi AK, Wightman B et Chalfie M (2015) A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook* 1-31  
10.1895/wormbook.1.177.1.
- Desse VE, Blanchette CR, Nadour M, Perrat P, Rivollet L, Khandekar A et Bénard CY (2021) Neuronal post-developmentally acting SAX-7S/L1CAM can function as cleaved fragments to maintain neuronal architecture in *C. elegans*. *Genetics*.
- Doitsidou M, Jarriault S et Poole RJ (2016) Next-Generation Sequencing-Based Approaches for Mutation Mapping and Identification in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 204: 451-474.
- Drabikowski K, Trzebiatowska A et Chiquet-Ehrismann R (2005) ten-1, an essential gene for germ cell development, epidermal morphogenesis, gonad migration, and neuronal pathfinding in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 282: 27-38.
- Driscoll M et Gerstbrein B (2003) Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration. *Nature reviews Genetics* 4: 181-194.
- Ellis HM et Horvitz HR (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44: 817-829.
- Emmons SW (2015) The beginning of connectomics: a commentary on White et al. (1986) 'The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*'. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 370:
- Feinberg EH et Hunter CP (2003) Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* 301: 1545-1547.
- Feinberg EH, Vanhoven MK, Bendesky A, Wang G, Fetter RD, Shen K et Bargmann CI (2008) GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems. *Neuron* 57: 353-363.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE et Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Fung W, Wexler L et Heiman MG (2020) Cell-type-specific promoters for *C. elegans* glia. *Journal of neurogenetics* 34: 335-346.

- Gally C et Bessereau JL (2003) [*C. elegans*: of neurons and genes]. *Médecine sciences : M/S (Paris)* 19: 725-734.
- Gilleard JS, Barry JD et Johnstone IL (1997) cis regulatory requirements for hypodermal cell-specific expression of the *Caenorhabditis elegans* cuticle collagen gene *dpy-7*. *Molecular and cellular biology* 17: 2301-2311.
- Gotenstein JR, Koo CC, Ho TW et Chisholm AD (2018) Genetic Suppression of Basement Membrane Defects in *Caenorhabditis elegans* by Gain of Function in Extracellular Matrix and Cell-Matrix Attachment Genes. *Genetics* 208: 1499-1512.
- Gotenstein JR, Swale RE, Fukuda T, Wu Z, Giurumescu CA, Goncharov A, Jin Y et Chisholm AD (2010) The *C. elegans* peroxidase PXN-2 is essential for embryonic morphogenesis and inhibits adult axon regeneration. *Development* 137: 3603-3613.
- Gouda K, Matsunaga Y, Iwasaki T et Kawano T (2010) An altered method of feeding RNAi that knocks down multiple genes simultaneously in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74: 2361-2365.
- Gray E, Thomas TL, Betmouni S, Scolding N et Love S (2008) Elevated matrix metalloproteinase-9 and degradation of perineuronal nets in cerebrocortical multiple sclerosis plaques. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 67: 888-899.
- Guo XD, Johnson JJ et Kramer JM (1991) Embryonic lethality caused by mutations in basement membrane collagen of *C. elegans*. *Nature* 349: 707-709.
- Gurskaya NG, Verkhusha VV, Shcheglov AS, Staroverov DB, Chepurnykh TV, Fradkov AF, Lukyanov S et Lukyanov KA (2006) Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nature biotechnology* 24: 461-465.
- Hallam SJ et Jin Y (1998) *lin-14* regulates the timing of synaptic remodelling in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 395: 78-82.
- Hammarlund M, Hobert O, Miller DM, 3rd et Sestan N (2018) The CeNGEN Project: The Complete Gene Expression Map of an Entire Nervous System. *Neuron* 99: 430-433.

- Hartman PS et Herman RK (1982) Radiation-sensitive mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 102: 159-178.
- Hedgecock EM, Sulston JE et Thomson JN (1983) Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 220: 1277-1279.
- Hesselson D, Newman C, Kim KW et Kimble J (2004) GON-1 and fibulin have antagonistic roles in control of organ shape. *Current biology : CB* 14: 2005-2010.
- Hobert O (2010) Neurogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *WormBook* 1-24. 10.1895/wormbook.1.12.2.
- Hohenester E et Yurchenco PD (2013) Laminins in basement membrane assembly. *Cell adhesion and migration* 7: 56-63.
- Howell K et Hobert O (2016) Small Immunoglobulin Domain Proteins at Synapses and the Maintenance of Neuronal Features. *Neuron* 89: 239-241.
- Huang CC, Hall DH, Hedgecock EM, Kao G, Karantza V, Vogel BE, Hutter H, Chisholm AD, Yurchenco PD et Wadsworth WG (2003) Laminin alpha subunits and their role in *C. elegans* development. *Development* 130: 3343-3358.
- Hunter CP, Winston WM, Molodowitch C, Feinberg EH, Shih J, Sutherlin M, Wright AJ et Fitzgerald MC (2006) Systemic RNAi in *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 71: 95-100.
- Hutter H et Suh J (2016) GExplore 1.4: An expanded web interface for queries on *Caenorhabditis elegans* protein and gene function. *Worm* 5: e1234659.
- Huzé C, Bauché S, Richard P, Chevessier F, Goillot E, Gaudon K, Ben Ammar A, Chaboud A, Grosjean I, Lecuyer HA, et al. (2009) Identification of an agrin mutation that causes congenital myasthenia and affects synapse function. *American journal of human genetics* 85: 155-167.
- Ihara S, Hagedorn EJ, Morrissey MA, Chi Q, Motegi F, Kramer JM et Sherwood DR (2011) Basement membrane sliding and targeted adhesion remodels tissue boundaries during uterine-vulval attachment in *Caenorhabditis elegans*. *Nature cell biology* 13: 641-651.

- Jafari G, Burghoorn J, Kawano T, Mathew M, Mörck C, Axäng C, Ailion M, Thomas JH, Culotti JG, Swoboda P, et al. (2010) Genetics of extracellular matrix remodeling during organ growth using the *Caenorhabditis elegans* pharynx model. *Genetics* 186: 969-982.
- Jayadev R et Sherwood DR (2017) Basement membranes. *Current biology : CB* 27: R207-r211.
- Jin Y (2005) Synaptogenesis. *WormBook* 1-11. 10.1895/wormbook.1.44.1.
- Judge DP et Dietz HC (2005) Marfan's syndrome. *Lancet* 366: 1965-1976.
- Kaletta T et Hengartner MO (2006) Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature reviews Drug discovery* 5: 387-398.
- Kamath RS et Ahringer J (2003) Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 30: 313-321.
- Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, Kanapin A, Le Bot N, Moreno S, Sohrmann M, et al. (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421: 231-237.
- Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG et Ahringer J (2001) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome biology* 2: 1-10.
- Kao G, Huang CC, Hedgecock EM, Hall DH et Wadsworth WG (2006) The role of the laminin beta subunit in laminin heterotrimer assembly and basement membrane function and development in *C. elegans*. *Developmental biology* 290: 211-219.
- Kawano T, Zheng H, Merz DC, Kohara Y, Tamai KK, Nishiwaki K et Culotti JG (2009) *C. elegans* mig-6 encodes papilin isoforms that affect distinct aspects of DTC migration, and interacts genetically with mig-17 and collagen IV. *Development* 136: 1433-1442.
- Keeley DP, Hastie E, Jayadev R, Kelley LC, Chi Q, Payne SG, Jeger JL, Hoffman BD et Sherwood DR (2020) Comprehensive Endogenous Tagging of Basement Membrane Components Reveals Dynamic Movement within the Matrix Scaffolding. *Developmental cell* 54(1): 60-74.

- Kelley LC, Chi Q, Cáceres R, Hastie E, Schindler AJ, Jiang Y, Matus DQ, Plastino J et Sherwood DR (2019) Adaptive F-Actin Polymerization and Localized ATP Production Drive Basement Membrane Invasion in the Absence of MMPs. *Developmental cell* 48: 313-328.e318.
- Khandekar A (2015) Age-related Changes in the Neuronal Architecture of *Caenorhabditis Elegans*: A Dissertation. *University of Massachusetts Medical School*.
- Kramer JM (2005) Basement membranes. *Wormbook* 1-15. doi/10.1895/wormbook.1.16.1.
- Kubota Y, Nagata K, Sugimoto A et Nishiwaki K (2012) Tissue architecture in the *Caenorhabditis elegans* gonad depends on interactions among fibulin-1, type IV collagen and the ADAMTS extracellular protease. *Genetics* 190: 1379-1388.
- Kuno K, Baba C, Asaka A, Matsushima C, Matsushima K et Hosono R (2002) The *Caenorhabditis elegans* ADAMTS family gene *adt-1* is necessary for morphogenesis of the male copulatory organs. *The Journal of biological chemistry* 277: 12228-12236.
- Kurshan PT, Phan AQ, Wang GJ, Crane MM, Lu H et Shen K (2014) Regulation of synaptic extracellular matrix composition is critical for proper synapse morphology. *The Journal of neuroscience* 34: 12678-12689.
- Kutscher LM et Shaham S (2014) Forward and reverse mutagenesis in *C. elegans*. *WormBook* 1-26. 10.1895/wormbook.1.167.1.
- Lewis JA et Fleming JT (1995) Basic culture methods. *Methods in cell biology* 48: 3-29.
- Ma J, Ma C, Li J, Sun Y, Ye F, Liu K et Zhang H (2020) Extracellular Matrix Proteins Involved in Alzheimer's Disease. *Chemistry* 26: 12101-12110.
- Mariol MC, Walter L, Bellemin S et Gieseler K (2013) A rapid protocol for integrating extrachromosomal arrays with high transmission rate into the *C. elegans* genome. *Journal of visualized experiments : JoVE* e50773.
- McRae PA et Porter BE (2012) The perineuronal net component of the extracellular matrix in plasticity and epilepsy. *Neurochemistry international* 61: 963-972.

- Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D et Ambros V (1991) Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *The EMBO journal* 10: 3959-3970.
- Meng L, Zhang A, Jin Y et Yan D (2016) Regulation of neuronal axon specification by glia-neuron gap junctions in *C. elegans*. *Elife* 5:
- Miller JP, Holcomb J, Al-Ramahi I, de Haro M, Gafni J, Zhang N, Kim E, Sanhueza M, Torcassi C, Kwak S, et al. (2010) Matrix metalloproteinases are modifiers of huntingtin proteolysis and toxicity in Huntington's disease. *Neuron* 67: 199-212.
- Mohamedi Y, Fontanil T, Cobo T, Cal S et Obaya AJ (2020) New Insights into ADAMTS Metalloproteases in the Central Nervous System. *Biomolecules* 10: 403.
- Morrissey MA et Sherwood DR (2015) An active role for basement membrane assembly and modification in tissue sculpting. *Journal of cell science* 128: 1661-1668.
- Nadour M, Biard M, St-Louis P, Rivollet L, Thackeray A, Bénard C (en préparation) MIG-6/Papilin mediates the long-term maintenance of neuronal architecture by regulating the extracellular matrix.
- Patten SA, Aggad D, Martinez J, Tremblay E, Petrillo J, Armstrong GA, La Fontaine A, Maios C, Liao M, Ciura S, et al. (2017) Neuroleptics as therapeutic compounds stabilizing neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. *JCI Insight* 2:
- Philbrook A, Ramachandran S, Lambert CM, Oliver D, Florman J, Alkema MJ, Lemons M et Francis MM (2018) Neurexin directs partner-specific synaptic connectivity in *C. elegans*. *Elife* 7:
- Pocock R, Bénard CY, Shapiro L et Hobert O (2008) Functional dissection of the *C. elegans* cell adhesion molecule SAX-7, a homologue of human L1. *Molecular and cellular neurosciences* 37: 56-68.
- Porta-de-la-Riva M, Fontrodona L, Villanueva A et Cerón J (2012) Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. *Journal of visualized experiments : JoVE* e4019.

- Qadota H, Blangy A, Xiong G et Benian GM (2008) The DH-PH region of the giant protein UNC-89 activates RHO-1 GTPase in *Caenorhabditis elegans* body wall muscle. *Journal of molecular biology* 383: 747-752.
- Qadota H, Inoue M, Hikita T, Köppen M, Hardin JD, Amano M, Moerman DG et Kaibuchi K (2007) Establishment of a tissue-specific RNAi system in *C. elegans*. *Gene* 400: 166-173.
- Qin J, Liang J et Ding M (2014) Perlecan antagonizes collagen IV and ADAMTS9/GON-1 in restricting the growth of presynaptic boutons. *The Journal of neuroscience* 34: 10311-10324.
- Qu W, Ren C, Li Y, Shi J, Zhang J, Wang X, Hang X, Lu Y, Zhao D et Zhang C (2011) Reliability analysis of the Ahringer *Caenorhabditis elegans* RNAi feeding library: a guide for genome-wide screens. *BMC Genomics* 12: 170.
- Ramirez-Suarez NJ, Belalcazar HM, Salazar CJ, Beyaz B, Raja B, Nguyen KCQ, Celestrin K, Fredens J, Færgeman NJ, Hall DH, et al. (2019) Axon-Dependent Patterning and Maintenance of Somatosensory Dendritic Arbors. *Developmental cell* 48: 229-244.e224.
- Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ et Priess JR (1997) *C. elegans* II. Dans *C. elegans II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor.
- Sakai LY, Keene DR, Renard M et De Backer J (2016) FBN1: The disease-causing gene for Marfan syndrome and other genetic disorders. *Gene* 591: 279-291.
- Sasakura H, Inada H, Kuhara A, Fusaoka E, Takemoto D, Takeuchi K et Mori I (2005) Maintenance of neuronal positions in organized ganglia by SAX-7, a *Caenorhabditis elegans* homologue of L1. *The EMBO journal* 24: 1477-1488.
- Schmitz C, Wacker I et Hutter H (2008) The Fat-like cadherin CDH-4 controls axon fasciculation, cell migration and hypodermis and pharynx development in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 316: 249-259.
- Schwarz EM (2005) Genomic classification of protein-coding gene families. *WormBook* 1-23. 0.1895/wormbook.1.29.1.
- Shen X, Ellis RE, Lee K, Liu CY, Yang K, Solomon A, Yoshida H, Morimoto R, Kurnit DM, Mori K, et al. (2001) Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell* 107: 893-903.

- Singhvi A et Shaham S (2019) Glia-Neuron Interactions in *Caenorhabditis elegans*. *Annual review of neuroscience* 42: 149-168.
- Smyth N, Vatanserver HS, Murray P, Meyer M, Frie C, Paulsson M et Edgar D (1999) Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *The Journal of cell biology* 144: 151-160.
- Stiernagle T (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook* 1-11. 10.1895/wormbook.1.101.1.
- Theocharis AD, Manou D et Karamanos NK (2019) The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *The FEBS journal* 286: 2830-2869.
- Thompson O, Edgley M, Strasbourger P, Flibotte S, Ewing B, Adair R, Au V, Chaudhry I, Fernando L, Hutter H, et al. (2013) The million mutation project: a new approach to genetics in *Caenorhabditis elegans*. *Genome research* 23: 1749-1762.
- Timmons L, Court DL et Fire A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263: 103-112.
- Timmons L et Fire A (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395: 854.
- Volovik Y, Marques FC et Cohen E (2014) The nematode *Caenorhabditis elegans*: a versatile model for the study of proteotoxicity and aging. *Methods* 68: 458-464.
- Wang J et Barr MM (2005) RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Methods in enzymology* 392: 36-55.
- Wang X, Kweon J, Larson S et Chen L (2005) A role for the *C. elegans* L1CAM homologue *lad-1/sax-7* in maintaining tissue attachment. *Developmental biology* 284: 273-291.
- Whangbo JS, Weisman AS, Chae J et Hunter CP (2017) SID-1 Domains Important for dsRNA Import in *Caenorhabditis elegans*. *G3 : genes - genomes - genetics* 7: 3887-3899.

- White JG, Southgate E, Thomson JN et Brenner S (1986) The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 314: 1-340.
- Wood WB (1988) Determination of pattern and fate in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 5: 57-78.
- Yamada K, Hirotsu T, Matsuki M, Butcher RA, Tomioka M, Ishihara T, Clardy J, Kunitomo H et Iino Y (2010) Olfactory plasticity is regulated by pheromonal signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 329: 1647-1650.
- Yamada M et Sekiguchi K (2015) Molecular Basis of Laminin-Integrin Interactions. *Current topics in membranes* 76: 197-229.
- Yemini E, Lin A, Nejatbakhsh A, Varol E, Sun R, Mena GE, Samuel ADT, Paninski L, Venkatachalam V et Hobert O (2021) NeuroPAL: A Multicolor Atlas for Whole-Brain Neuronal Identification in *C. elegans*. *Cell* 184: 272-288.e211.
- Yoshina S et Mitani S (2015) Loss of *C. elegans* GON-1, an ADAMTS9 Homolog, Decreases Secretion Resulting in Altered Lifespan and Dauer Formation. *PLoS One* 10: e0133966.
- Yuan J, Angelucci E, Lucarelli G, Aljurf M, Snyder LM, Kiefer CR, Ma L et Schrier SL (1993) Accelerated programmed cell death (apoptosis) in erythroid precursors of patients with severe beta-thalassemia (Cooley's anemia). *Blood* 82: 374-377.
- Yurchenco PD (2015) Integrating Activities of Laminins that Drive Basement Membrane Assembly and Function. *Current topics in membranes* 76: 1-30.
- Zallen JA, Kirch SA et Bargmann CI (1999) Genes required for axon pathfinding and extension in the *C. elegans* nerve ring. *Development* 126: 3679-3692.
- Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T, de Bakker PI, Abecasis GR, Almgren P, Andersen G, et al. (2008) Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nature genetics* 40: 638-645.
- Zhang L, Ward JD, Cheng Z et Dernburg AF (2015) The auxin-inducible degradation (AID) system enables versatile conditional protein depletion in *C. elegans*. *Development* 142: 4374-4384.