



HAL
open science

Contrôle de la polarité planaire pendant la morphogénèse chez *C. elegans*

Thibault Brugière

► **To cite this version:**

Thibault Brugière. Contrôle de la polarité planaire pendant la morphogénèse chez *C. elegans*. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. dumas-01707879

HAL Id: dumas-01707879

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01707879v1>

Submitted on 13 Feb 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AGROCAMPUS
OUEST

CFR Angers

CFR Rennes



UNIVERSITÉ DE
RENNES 1



Année universitaire : 2016 – 2017

Spécialité : SCMV

Sciences Cellulaire et Moléculaire du vivant

Spécialisation (et option éventuelle) :
.....

Mémoire de Fin d'Études

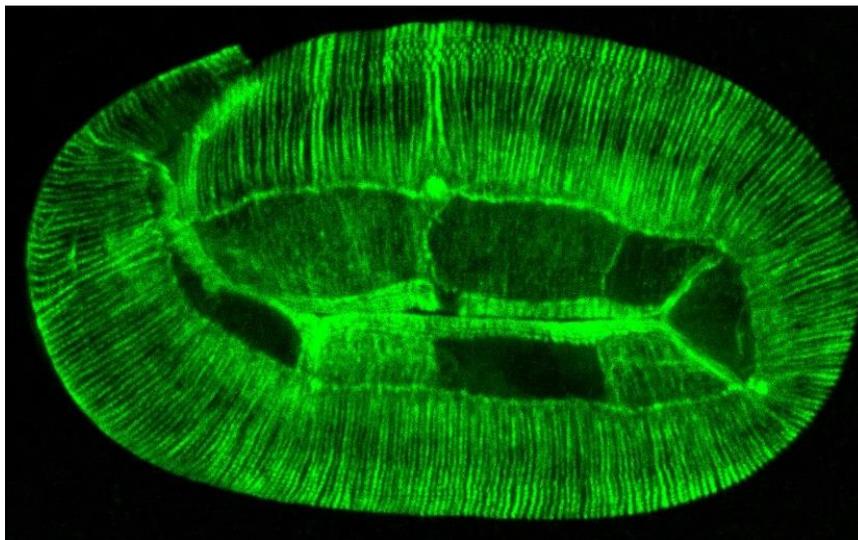
d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage

de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage

d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Contrôle de la polarité planaire pendant la morphogenèse chez *C. elegans*

Par : Thibault BRUGIERE



Soutenu à Rennes le 12/06/2017

Devant le jury composé de : (Nom, Qualité)

- PAILLARD Luc

- LECERF Frédéric

- JAULIN Christian

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Confidentialité :

Non Oui si oui : 1 an 5 ans 10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible⁽¹⁾.

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant).

Date et signature du maître de stage⁽²⁾ :

Droits d'auteur :

L'auteur⁽³⁾ autorise la diffusion de son travail

Oui Non

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

Date et signature de l'auteur :

Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant :

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé

Oui Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant :

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(2) Signature et cachet de l'organisme

(3).Auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(4) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option)) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé

Remerciements :

Merci à tous ceux qui m'ont permis d'arriver ici. A commencer par mes professeurs de CPGE, en particulier Mme Cordonnier, professeur en Biologie qui m'a poussé à venir faire mes études à Rennes.

Merci à Grégoire de m'avoir accepté en Stage dans son équipe, de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche, mais aussi aidé à choisir mon parcours professionnel. Merci aussi à toute l'équipe *C. elegans* pour leur soutien durant ces cinq mois. Merci à toutes les personnes de l'IGDR et de la plateforme de microscopie pour leur aide dans mon travail.

Merci à mes amis pour ces trois années merveilleuses à Rennes, mes trois dernières et mes trois meilleures années en tant qu'étudiant.

Table des matières

Liste des abréviations :	4
I) Introduction	1
1) Les cellules épithéliales	1
2) La polarité apico-basale	1
3) La polarité planaire	2
4) La morphogenèse chez <i>C. elegans</i>	4
5) Le rôle de PAR-3 dans la polarité planaire pendant l'élongation des embryons.....	7
6) Contrôle mécanique de la polarité cellulaire planaire.....	8
7) Le rôle de CDC-42.....	9
II) Matériel et méthodes	9
1) Culture des vers.....	9
2) Souches et croisement.....	10
3) Conservation des souches	11
4) Préparation des bactéries pour l'ARNi	11
5) Observations au microscope	12
6) Analyse et quantifications.....	12
III) Résultats.....	14
1) Le rôle des contractions musculaires pour la polarisation de PAR-3	14
2) Les différents acteurs du module PAR	15
3) Le rôle de CDC-42 dans la polarisation du module PAR.....	17
4) Le rôle de CDC-42 dans la polarisation de l'actine.....	18

IV) Discussion.....	19
Références Bibliographiques.....	22
Résumé	1

Liste des abréviations :

ABD : Actin Binding Domain	MYPT : myosine phosphatase
A-P : Antéro-Postérieur	NGM : Nematode Growth Medium
ARNi : Acide RiboNucléique interférant	PAK : p21 activated kinase
CDC-42 : Cell division control protein 42 homolog	PAR : Partitioning Defective
CeHD : <i>Caenorhabditis elegans</i> Hémidesmosomes	PIX : PAK-interacting exchange factor
CRB : Crumbs	Pk : Prickle
Dgo : Diego	P-D : Proximo-Distal
Ds : Dachsous	PCP : Planar Cell Polarity
Dsh : Dishevelled	PMT : PhotoMultiplificateur (détecteur du microscope)
D-V : Dorso-Ventral	RFP : Red Fluorescent Protein
Fj : Furjointed	SCRIB : Scribble
Fmi : Flamingo	TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
Ft : Fat	UNC : Uncoordinated
Fz : Frizzled	Vang : Vang Gogh
GAP : GTPase Activating Factor	WT : Wild Type = Sauvages
GEF : Guanine Exchange Factor	
GIT : G-protein-coupled receptor kinase interactor	
GFP : Green Fluorescent Protein	
GTP : Guanine TriPhosphate	
Hyd : hybride (capteur du microscope)	
MRLC : Myosin Regulatory Light Chain	

I) Introduction

1) Les cellules épithéliales

Chez les êtres vivants pluricellulaires, beaucoup de tissus sont organisés en épithélium ; ceux-ci correspondent à des cellules jointives, organisées sur une surface et présentant deux grandes fonctions : une fonction glandulaire et une fonction de revêtement. On citera par exemple les cellules qui tapissent l'épithélium bronchial, qui sécrètent le mucus et munies de cils qui permettent son excrétion vers les voies aériennes supérieures ; les cellules intestinales, qui permettent grâce à leur membrane apicale présentant des microvillosités l'absorption des nutriments présents dans la lumière de l'intestin ; les cellules pulmonaires qui permettent le passage de l'oxygène depuis l'air contenu dans les poumons jusque dans le sang et l'évacuation du dioxyde de carbone de l'organisme ou les cellules de l'épiderme, qui permettent de protéger les individus des agressions externes à l'organisme.

Ces cellules sont polarisées : cela signifie qu'elles organisent leur membrane plasmique, leur cytosquelette et leurs compartiments intracellulaires selon un axe défini et en lien avec leur fonction (Rodriguez-Boulanger E. et al., 2014).

2) La polarité apico-basale

L'un des meilleurs exemples de cellule épithéliale est la cellule acineuse pancréatique, cellule excrétrice, structurée selon un axe apico-basal. Ainsi la membrane basale se trouve à proximité de capillaires sanguins qui permettent une alimentation de la cellule en nutriments. Dans la partie basale sont présents le noyau et le réticulum endoplasmique rugueux, signe d'une intense production de protéines transloquées dans la lumière du réticulum endoplasmique. En remontant vers le côté apical de la cellule on trouve l'appareil de Golgi, important dans la maturation des protéines. De l'appareil de Golgi bourgeonnent des vésicules qui s'accumulent au pôle apical, formant les grains de zymogène, et permettent le stockage des protéines en attendant leur sécrétion. La sécrétion se fait via la membrane apicale qui présente des microvillosités permettant d'augmenter la surface de celle-ci. Un trafic rétrograde de vésicules depuis la membrane apicale vers les compartiments intracellulaires permet de compenser le trafic de membrane dû à la sécrétion. Enfin la membrane latérale présente des jonctions ce qui permet d'une part une communication avec les autres cellules, via les jonctions gap, pour permettre un fonctionnement coordonné de l'acinus et d'autre part d'assurer l'intégrité du tissu via les jonctions d'adhérence ainsi qu'une séparation entre intérieur et extérieur de l'organisme, via les desmosomes et les jonctions serrées (Figure 1) (Maillet M. et al., 1990).

La mise en place et le maintien de cette organisation repose sur les déterminants de polarité qui forment un ensemble de protéines qui coopèrent pour établir et maintenir la polarité apico-basale. Les modules PAR (Partitioning Defective) et CRB (Crumbs) sont retrouvés au niveau de la membrane apicale des cellules tandis que le module SCRIB (Scribble) est localisé à la membrane baso-latérale (Rodriguez-Boulan E. et al., 2014).

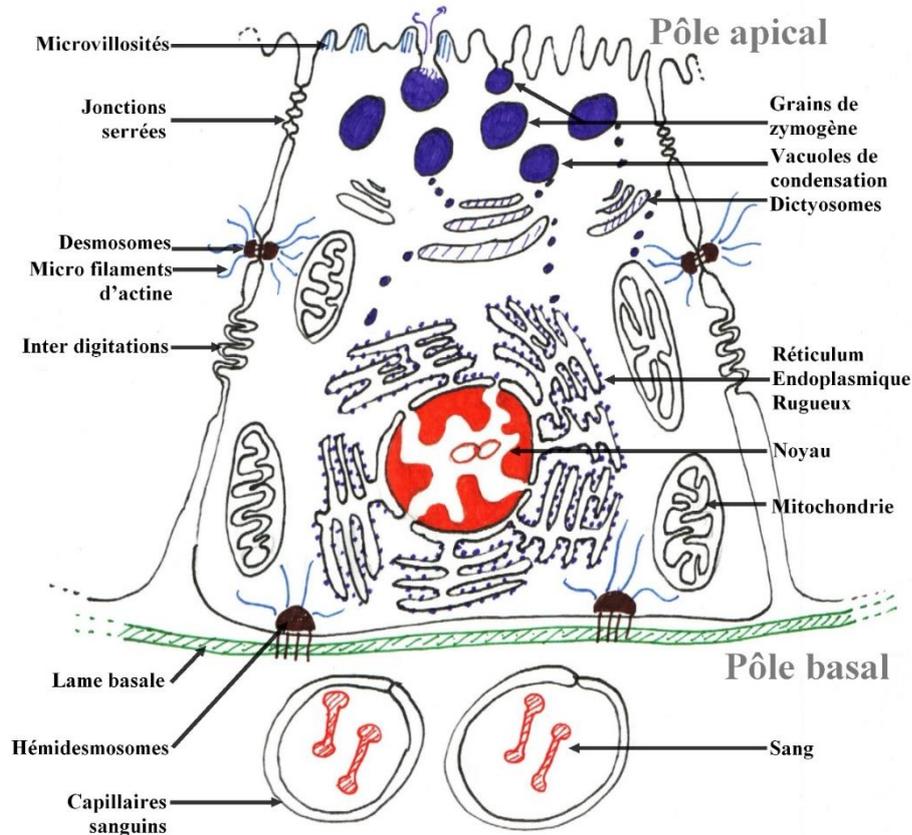


Figure 1 : *Structure polarisée apico-basale de la cellule acineuse pancréatique. Sa structure est à mettre en lien avec sa fonction excrétrice. (D'après Peycru P. 2010)*

3) La polarité planaire

Associée à cette polarité apico-basale, on retrouve, dans certains systèmes épithéliaux, une polarité planaire (PCP pour Planar Cell Polarity). Celle-ci fait référence à une polarisation dans le plan de la membrane apicale. On retrouve par exemple sur l'épiderme de l'aile de drosophile une polarisation proximo-distale (P-D) des cellules dont les trichomes pointent vers la partie distale de l'aile. Cette polarité présente beaucoup de rôles, par exemple la localisation des stéréocils de la cochlée chez les mammifères (Montcouquiol M. et al., 2003). Mais elle est aussi importante pour l'acquisition d'une forme définie des organes, ou morphogenèse, lors du développement embryonnaire des animaux. Ce phénomène implique en effet des divisions,

migrations, intercalations cellulaires et un remodelage des jonctions qui doivent être contrôlés finement dans le temps et dans l'espace. La PCP a été beaucoup étudiée chez la drosophile et chez les mammifères (Yih W. et all., 2016).

La mise en place de la PCP nécessite dans un premier temps un signal directionnel selon l'axe du tissu (par exemple l'axe P-D de l'aile de drosophile) amenant à une répartition asymétrique des marqueurs de polarité qui permet elle-même une régulation du cytosquelette et donc une morphologie polarisée planaire. La différence entre la polarisation apico-basal classique et la PCP est la propagation directe d'un signal, couplé à la formation d'hétérodimères entre protéines de marquage de la PCP (Yih W. et all., 2016).

La voie principale de la PCP (Figure 2A) repose sur les protéines transmembranaires Flamingo (Fmi), Frizzled (Fz) et Van Gogh (Vang) et les protéines cytosoliques Prickle (Pk), Dishevelled (Dsh) et Diego (Dgo). Vang et Pk se retrouve du côté antérieur/proximal de la cellule tandis que Fz, Dsh et Dgo se retrouvent du côté postérieur/distal de la cellule. Vang et Fz forment des hétérodimères au niveau des liaisons entre les cellules, tout en s'excluant mutuellement au sein de la même cellule tandis que Fmi permet leur interaction. La localisation asymétrique de ces marqueurs est interprétée comme l'amplification d'une différence initiale de localisation des différentes protéines. Le signal est ensuite renforcé au sein de la cellule par l'interaction avec les protéines cytosoliques. La transmission de ce signal de cellule en cellule conduit à la mise en place et au maintien d'une PCP le long de l'axe A-P ou P-D (Yih W. et all., 2016).

La voie Fat-Dachsous-Furjointed (Ft-Ds-Fj) (Figure 2B) est importante pour la formation de l'aile de drosophile. Ft et Ds sont des protocadhérines qui forment des hétérodimères et interagissent avec la kinase associée au Golgi Fj. Fj phosphoryle le domaine extracellulaire de Ft et Ds ce qui augmente l'activité de Ft et diminue celle de Ds. Ds et Fj sont exprimées selon un fort gradient au niveau cellulaire le long de l'aile de drosophile (Ds côté proximal et Fj côté distal) (Yih W. et all., 2016).

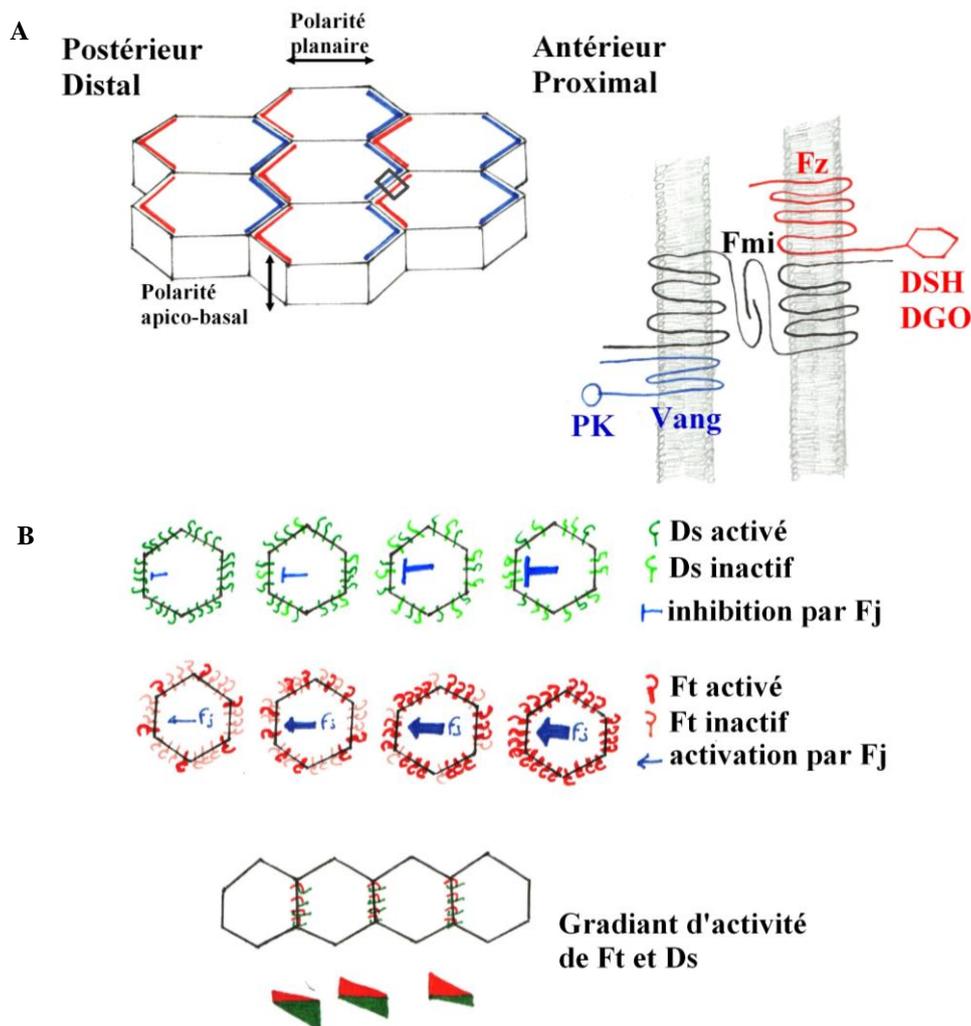


Figure 2 : **Les voies de la polarité cellulaire planaire.** (A) La voie de la PCP classique avec Pk et Vang du côté antérieur/proximal et Dsh, Dgo et Fz du côté distal, Fmi permet l'interaction des protéines membranaires (adapté d'après Yih W. 2016). (B) La voie Fat-Dachsous-Furjointed. Ds et Fj sont exprimés selon un gradient le long de l'aile (Ds côté Proximal et Fj côté distal) ; par phosphorylation, Fj active Ft et inactive Ds. Cela amène à un gradient d'activité des deux protéines membranaires et permet leur interaction orientée dans les cellules le long de l'aile (adapté d'après Yih W. 2016).

4) La morphogénèse chez *C. elegans*

La simplicité d'utilisation de *Cænorhabditis elegans* en fait un très bon organisme modèle pour l'étude du développement en laboratoire.

Le développement embryonnaire se compose de plusieurs phases (Vuong-Brender T. T.K. et all., 2016) avec une première étape de prolifération cellulaire qui amène à l'apparition de toutes les cellules embryonnaires, dont six rangées de cellules de l'épiderme avec du centre vers les côtés : deux rangées dorsales, deux latérales et deux ventrales. Elle est suivie d'une phase de morphogénèse. La première étape de la morphogénèse est l'intercalation dorsale au cours de laquelle les deux rangées de cellules dorsales migrent en s'intercalant pour ne former

qu'une unique rangée de cellules. Ensuite, lors de la fermeture ventrale, les cellules ventrales de l'épiderme migrent jusqu'au niveau du ventre de l'embryon où elles se rejoignent pour fermer l'épiderme et entourer l'individu. L'embryon ressemble alors à un haricot (stade lima beam) équivalent au stade 1 fold.

La suite de la morphogénèse correspond à un allongement de l'embryon dans l'axe longitudinal passant au stade 1,5 fold puis 2 fold et 3 fold pour atteindre un allongement final d'un facteur 4 selon l'axe A-P et un rétrécissement d'un facteur 3 selon l'axe D-V en seulement 3 heures. A la fin de cette étape les larves éclosent. Il est intéressant de noter que l'élongation se déroule en l'absence de division, de migration et de réarrangement cellulaire et que le seul processus impliqué est le changement de forme des cellules (Figure 3) (Vuong-Brender T. T.K. et all., 2016).

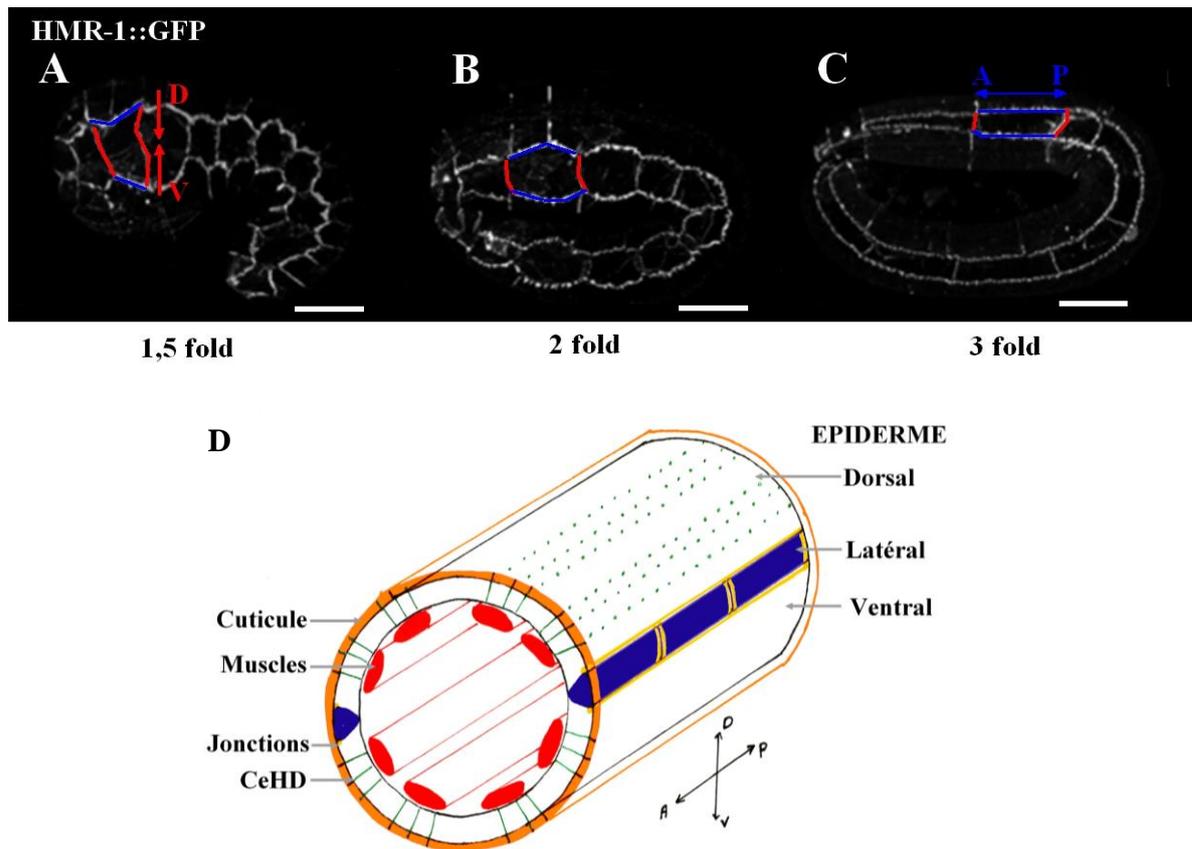


Figure 3 : **Modification de la forme des cellules de l'épiderme lors de la morphogénèse et tissus impliqués dans le processus.** (A) Si on observe la E-cadhérine dans l'épiderme d'embryons de *C. elegans* (HMR-1::GFP), on remarque que les cellules sont d'abord allongées dans l'axe D-V au stade 1,5 fold (B) puis elles deviennent carrées au stade 2 fold (C), plus tard celles-ci se retrouvent allongées selon l'axe A-P au stade 3 fold. (D) Les différents tissus nécessaires à l'élongation sont les cellules de l'épiderme (cellules dorsales, latérales et ventrales) ainsi que les muscles, reliés aux cellules dorso-ventrales par les CeHD. (Image de HMR-1::GFP par Grégoire Michaux, barres d'échelle 10µm).

La transmission des mouvements musculaires à l'épiderme nécessite la maturation des CeHD (*Caenorhabditis elegans* Hémidesmosomes). Celle-ci est induite par les contractions des muscles situés sous l'épiderme qui activent GIT-1 (G-protein-coupled receptor kinase interactor) et entraîne le recrutement du complexe PAK-1 (p21 activated kinase), PIX-1 (PAK interacting exchange factor) conduisant à la phosphorylation et donc stabilisation des filaments intermédiaires par PAK-1 (Figure 4) (Zhang H. et al., 2011).

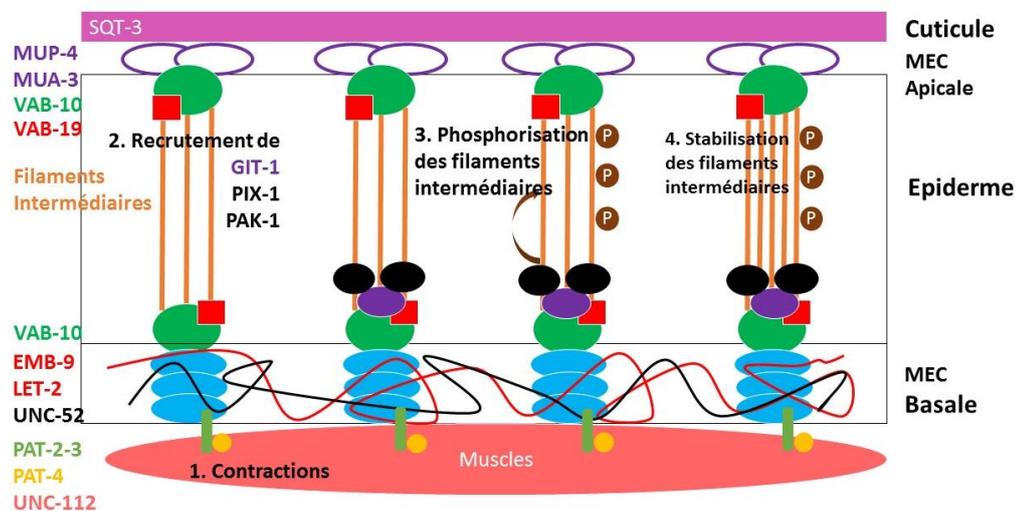


Figure 4 : **Contrôle mécanique de la mise en place des CeHD dans l'épiderme dorso-ventral.** Les contractions musculaires activent le GIT-1 ce qui amène au recrutement de PIX-1 et PAK-1 qui phosphorylent les filaments intermédiaires. Cela permet une stabilisation de ces derniers, ce qui est important pour la morphogénèse.

Jusqu'au stade 2 fold, l'élongation se fait grâce à la traction des câbles d'acto-myosine dans l'épiderme. La suite de l'élongation nécessite les contractions des muscles situés sous l'épiderme dorso-ventral de l'individu, dans la mesure où des embryons dont les muscles sont paralysés ne poursuivent pas leur élongation au-delà du stade 2 fold. (Vuong-Brender et al., 2017).

In fine, les forces de traction de l'acto-myosine tendent à diminuer le diamètre de l'embryon alors que son volume est constant, les forces de pression tendent alors à allonger l'individu. Tout ceci implique également un remodelage de la forme des cellules de l'épiderme qui se rétrécissent dans l'axe DV et s'allongent dans l'axe AP.

La régulation de la contraction du squelette d'acto-myosine est faite de manière fine dans les cellules latérales et D-V. Celle-ci est activée par phosphorylation des MRLC (Myosin Regulatory Light Chain) par la kinase LET-502/ROCK et désactivée par la MYPT (myosine phosphatase) MEL-11 qui est elle-même inactivée par LET-502. Les contractions sont quasi nulles dans l'épiderme dorso-ventral en raison d'une faible activité de LET-502, permettant

ainsi l'activité répressive de MEL-11. Dans l'épiderme latéral LET-502 est active ce qui permet les contractions de l'acto-myosine (C. Gally et al., 2009).

Au stade 1,5 fold les brins d'actine sont désorganisés dans les cellules latérales puis ils s'organisent dans le plan de l'épiderme en brins selon l'axe D-V au stade 2 fold. C'est à ce moment-là qu'apparaît la polarité planaire de l'actine dans l'épiderme latéral (Figure 5) (Vuong-Brender et al., 2017).

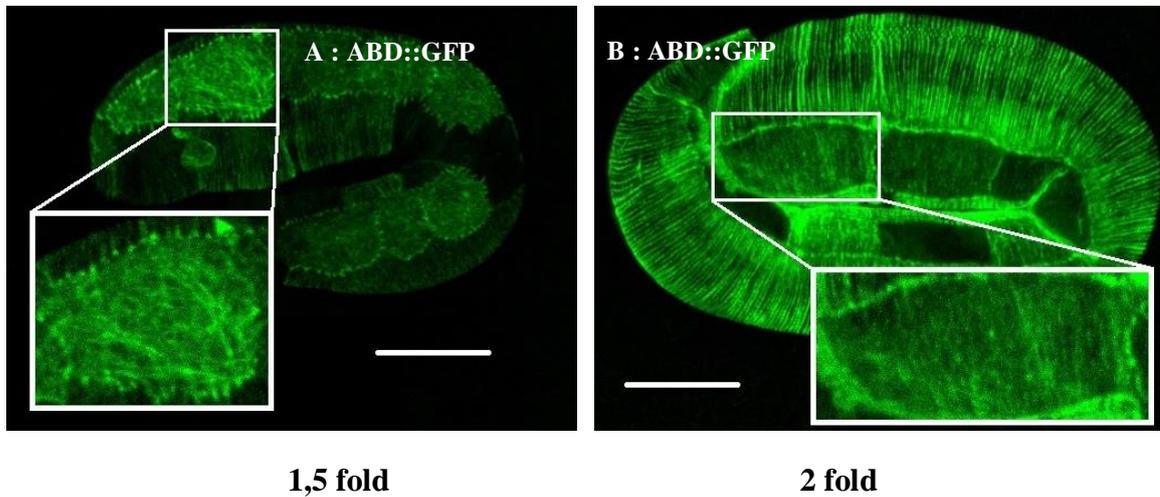


Figure 5 : **Polarisation de l'actine selon l'axe dorso-ventral dans les cellules latérales au stade 2 fold.** L'actine est observée via un domaine de liaison à l'actine lié à un marqueur GFP (ABD::GFP) exprimé par les vers. Dans les cellules latérales l'actine est d'abord désorganisée (A) puis elle s'organise selon l'axe dorso-ventral à partir du stade 2 fold (B). (Barres d'échelle 10 μ m).

5) Le rôle de PAR-3 dans la polarité planaire pendant l'élongation des embryons

Des expériences menées récemment au laboratoire ont montré l'importance de la protéine de polarité PAR-3 qui s'accumule davantage aux jonctions entre cellules latérales qu'aux jonctions entre cellules latérales et cellules DV (Figure 6A-C). La polarisation de PAR-3 contrôle ensuite la polarisation de l'actine dans l'épiderme latéral. En effet la déplétion de *par-3* par ARNi entraîne un défaut de polarisation de l'actine dans l'épiderme latéral, avec dans certaines cellules une polarisation selon l'axe A-P (Figure 6D, E) (Gillard G. et al., en prep).

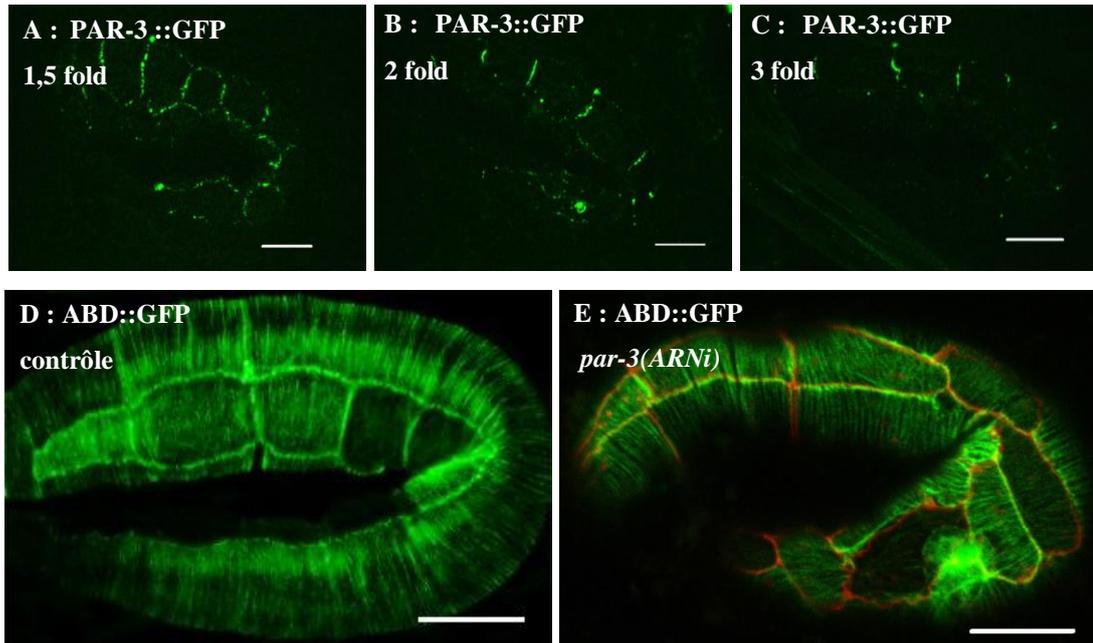


Figure 6 : *Le rôle du module de polarité PAR-3 dans le développement embryonnaire de C. elegans.* (A-C) PAR-3 se polarise au niveau des jonctions entre cellules latérales au fur et à mesure du développement embryonnaire. (D, E) Cette polarisation contrôle la polarisation des faisceaux d'actine. (Images A-C par Thibault Brugière ; images D, E par Ghislain Gillard).

6) Contrôle mécanique de la polarité cellulaire planaire

L'étude de la mise en place de la polarité de PAR-3 est intéressante car elle fait intervenir des voies de signalisation non seulement chimiques, mais aussi mécaniques. En effet il a aussi été démontré que la polarisation de PAR-3 est induite via les contractions musculaires, dans la mesure où la déplétion de UNC-52 et des autres composants des CeHD amène à une perte de la polarisation de PAR-3 (Figure 7A, B) (Gillard G. et al., en prep).

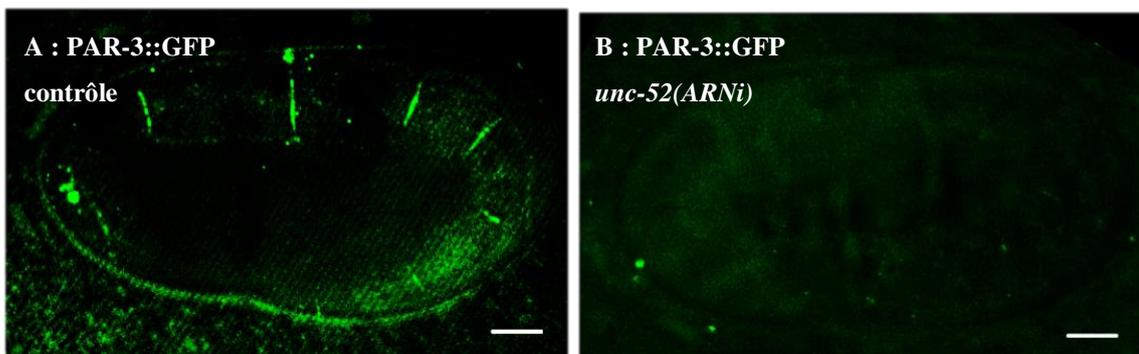


Figure 7 : *Le rôle des contractions musculaires pour la mise en place de la polarité de PAR-3.* La déplétion des composants des CeHD reliant les muscles aux cellules de l'épiderme entraîne une perte de la polarité de PAR-3. (Images par Gillard G.).

7) Le rôle de CDC-42

CDC-42 (Cell Division Control protein 42 homolog) est une GTPase dont le rôle cellulaire est le contrôle de l'actine. Son activité est régulée par les GEFs (pour Guanine nucléotide Exchange Factor) qui l'activent par fixation au GTP et par les GAP (pour GTPase Activating Protein) qui l'inactivent en lui faisant hydrolyser son GTP (Rodriguez-Boulan E. et all., 2014).

L'étude de son rôle lors de la morphogenèse est intéressante car elle participe au contrôle du cytosquelette d'actine (Cowan C. R. et all., 2007) et pourrait donc jouer un rôle pour la mise en place de la polarité planaire de l'actine. De plus CDC-42 est connu dans d'autres cellules épithéliales pour interagir avec le module PAR, en particulier PAR-6 (Shafaq-Zadah M. et all., 2012).

Il serait donc intéressant de savoir si, dans ce contexte, on retrouve un contrôle de l'actine par CDC-42 ainsi qu'une interaction entre CDC-42 et le module PAR.

II) Matériel et méthodes

1) Culture des vers

Les souches de vers de l'espèce *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) sont cultivées de façon routinière selon la méthode décrite par S. Brenner (1974) sur des boîtes de Petri sur NGM (Nematode Growth Medium : 3g/L de NaCl, 17g/L de Bactoagar, 2.5 g/L de Bactopeptone, 1L d'H₂O puis après autoclavage à 120°C pendant 20 min et retour à 60°C : 5 mg de cholestérol, 1mM de CaCl₂, 1mM de MgSO₄ et 25mM de KH₂PO₄ à pH6). Ceux-ci sont nourris via ensemencement des boîtes avec *Escherichia coli* (*E. coli* de la souche OP50) cultivées pendant 12h sur milieu LB liquide (milieu Luria-Bertani: 10g/L de bacto-tryptone, 5g/L de bacto-yeast extract, 10g/L de NaCl, ajustement du pH à 7 avec une solution de NaOH puis autoclavage 20 minutes). Les vers sont maintenus dans une étuve à 20°C (sauf mention spéciale et souches thermosensibles qui sont cultivés à 15°C). Les vers sont repiqués à l'aide d'une pique en platine, selon l'épuisement en bactéries des boîtes de culture et le besoin futur pour les expériences. En cas de contamination bactérienne, une dizaine d'adultes sont déposés dans une goutte d'un mélange 1:1 eau de javel (2mM) et NaOH (2mM) sur une boîte fraîche. Cela a pour effet de détruire les bactéries contaminantes et de dissoudre les adultes alors que la cuticule des œufs résiste à ce mélange. Après évaporation du mélange, les œufs éclosent et les larves colonisent la boîte de Petri.

Pour les expériences d'ARNi par alimentation, on ajoute au NGM de la Carbenicilline (50 µg/mL) et de l'IPTG (2mM) pour le maintien du plasmide et induire la production d'ARN double brin. Le milieu est alors coulé sur boîte 12 puits. Les boîtes sont conservées (<1 mois) à 4°C avant utilisation.

Pour l'expérience, une goutte de culture bactérienne en milieu LB liquide de la souche ARNi est déposée dans chaque puit. Après culture des bactéries, de jeunes adultes sont ajoutés dans les puits. Cinq heures avant observation des embryons les vers sont déplacés dans un puit contenant les mêmes bactéries pour s'assurer que les œufs récoltés aient un temps de développement adéquat.

2) Souches et croisement

Génotype	Origine
<i>abd::gfp dlg-1::rfp</i>	Michel Labouesse
<i>par-3::gfp dlg-1::rfp</i>	CRISPR – K. Kemphues
<i>par-6::gfp dlg-1::rfp</i>	CRISPR – K. Kemphues
<i>pkc-3::gfp dlg-1::rfp</i>	CRISPR – K. Kemphues
<i>pkc-3(ne4246) dlg-1::rfp</i>	G. Michaux
<i>cdc-42::gfp</i>	Michael Hentgartner
<i>dlg-1::rfp</i>	M. Labouesse
<i>Let-805::gfp dlg-1::rfp</i>	CRISPR - Michel Labouesse
<i>unc-105(n506) par-3::gfp dlg-1::rfp</i>	G. Michaux

*Tableau 1 : récapitulatif des souches utilisées. La mention CRISPR signifie que les souches ont été générées selon la technique du CRISPR Cas-9. Le marqueur GFP est exprimé avec la protéine endogène des vers. L'allèle *pkc-3(ne4246)* correspond à un allèle thermosensible du gène *pkc-3*.*

Les populations étant composées en grande majorité d'individus hermaphrodites auto-féconds (995 ‰), les croisements entre souches pour associer différents marqueurs ou mutations nécessitent la production d'individus mâle par stress thermique (deux cycles de 12h avec choc thermique à 33°C). Un haut ratio de mâles/hermaphrodites (4 /1) est créé lors des croisements pour leur amplification.

Le génotype d'intérêt est créé par reproduction sexuée avec des individus mâles et hermaphrodites des souches à croiser (4/1). Les hermaphrodites de la génération F2 sont clonés par repiquage, puis la sélection est faite selon le phénotype de leur descendance F3 (pour

vérifier l'homozygotie). Dans le cas de mutations un séquençage est réalisé pour confirmer le phénotype observé.

Mâles	Hermaphrodites	Génotype final
<i>par-3::gfp dlgl-1::rfp</i>	<i>pkc-3(ne4246) dlgl-1::rfp</i>	<i>par-3::gfp dlgl-1::rfp pkc-3(ne4246)</i>
<i>cdc-42::gfp</i>	<i>dlgl-1::rfp</i>	<i>cdc-42::gfp dlgl-1::rfp</i>

Tableau 2 : Croisements de souches réalisés lors de mon stage.

3) Conservation des souches

En dehors d'une utilisation routinière, les souches peuvent être conservées à 15°C sur boîte de culture jusqu'à 4 mois en l'absence de nourriture. Les individus arrêtent simplement leur croissance et la ponte.

Pour le stockage à long terme, plusieurs centaines de souches sont congelées dans la banque du laboratoire à -80°C. Pour cela une boîte contenant beaucoup de larves au stade L1 est lavée à l'aide d'un ml de tampon M9 pour nématode (KH₂PO₄ 3g/L, Na₂HPO₄ 6g/L, NaCl 5g/L, puis après autoclave ajout de 1mL/L de MgSO₄ à 1mol/L) qui est récupéré dans un tube de congélation dans lequel est ajouté un volume équivalent de milieu de congélation (129 ml 0.05 M K₂HPO₄, 871 ml 0.05 M KH₂PO₄, 5.85 g NaCl, ajout de 30% v/v de glycérol puis autoclavage). Les tubes à congeler sont placés à -80°C. Un tube surnuméraire sera décongelé au bout de 3 semaines pour vérifier que l'étape de congélation s'est bien déroulée.

4) Préparation des bactéries pour l'ARNi

Pour l'ARNi par alimentation, le laboratoire dispose d'une banque de bactéries conservées à -80°C permettant de cibler 85% des gènes de *C. elegans* (kamath R. S. & Ahringer J. 2003). Les bactéries ont été créées en clonant le fragment d'ADN obtenu par PCR dans le plasmide Timmons & Fire (L4440). Ce plasmide est sous contrôle d'un promoteur T7 sur chaque brin d'ADN du gène d'intérêt, ce qui permet après exposition à l'IPTG l'expression d'un ARN double brin ensuite internalisé par *C. elegans*. Les fragments génomiques clonés dans le plasmide L4440 sont transformés dans des *E. coli* déficientes en ARNase III (souche HT115).

Après avoir été étalées sur boîtes de Petri depuis la banque à -80°C (milieux LB, Bactoagar 17g/L, Ampicilline 100µg/mL) et cultivées pendant 12h à 37°C, celles-ci sont conservées à 4°C pour une utilisation routinière et repiquées tous les 3 mois. Pour l'utilisation lors des expériences, les bactéries sont cultivées 10-14h en milieu LB liquide contenant 100µg/mL de cabernicilline afin de maintenir le plasmide d'expression.

Pour confirmer le gène ciblé par l'ARNi, le plasmide est séquencé puis le phénotype est confirmé par observation au microscope du gène marqué par GFP déplété par ARNi et du contrôle (L4440) (Figure 8) (voir II.1 pour la culture des vers en ARNi par alimentation).

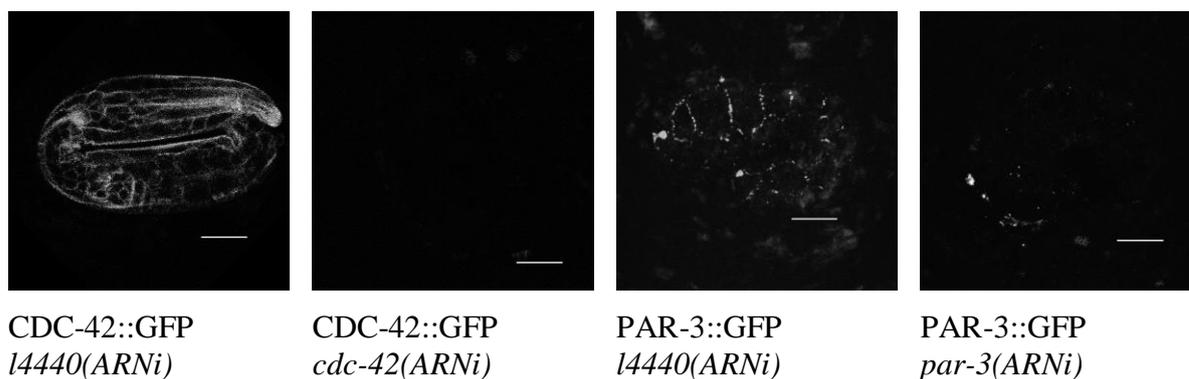


Figure 8 : **Confirmation de l'efficacité des ARNi sur le phénotype des embryons.** On constate la disparition du marqueur fluorescent, visible pour l'ARNi L4440 (contrôle), mais qui n'est pas observé en cas d'ARNi contre le gène d'intérêt. LEICA confocal SPE

5) Observations au microscope

Le montage des embryons se fait sur coussin d'agarose 2%. Dans un premier temps des bactéries OP50 (provenant d'une boîte de culture de vers) sont déposées sur le coussin d'agarose. Les embryons sont déposés dans les bactéries avec 5 μ L de milieu M9 ; enfin la lamelle est déposée. Les bactéries permettent de bloquer les mouvements par asphyxie en éliminant l'oxygène présent dans le milieu, ce qui permet d'imager des embryons immobilisés.

L'observation se fait ensuite à l'aide d'un microscope confocal (Leica SPE, SP5 ou SP8) équipé d'un objectif à immersion 63x et les acquisitions se font avec le logiciel LAS-AF. Ils sont équipés de laser diode ou argon à 488nm pour la GFP et d'un laser diode à 561 nm pour la RFP ainsi que de détecteur PMT (PhotoMultiplificateur) ou Hybride selon le microscope ou l'utilisation, réglés sur 493-537nm pour détecter la GFP et 566-620nm pour la RFP. Les embryons sont imagés avec une pile en Z tous les 0.3 μ m (environ 20 à 30 images par embryon) et les images observées correspondent à la projection maximale du signal des images obtenues.

6) Analyse et quantifications

Lors des quantifications, les images utilisées correspondent à la projection maximale des piles obtenues pour chaque embryon.

Les mesures de quantification relative des marqueurs de polarité à la membrane sont réalisées sur les images, acquises au microscope confocal Leica SPE, à l'aide d'ImageJ. L'intensité est mesurée sur le signal GFP (en s'aidant du signal DLG-1::RFP pour localiser les

membranes) sur les jonctions entre cellules latérales 1 et 2 (Figure 9A a), 2 et 3 (Figure 9A b) et 3 et 4 (Figure 9A c). Pour chaque mesure, le trait est déplacé dans le cytoplasme (Figure 9A a', b' et c'). La valeur pour chaque individu est donnée selon la formule suivante :

$$Polarisation = \frac{\frac{Signal\ a}{Signal\ a'} + \frac{Signal\ b}{Signal\ b'} + \frac{Signal\ c}{Signal\ c'}}{3}$$

Dans le cas de quantifications absolues, pour une meilleure précision de mesure et minimiser une variation de la puissance du laser en fonction des expériences, les images sont réalisées au confocal Leica SP8. La mesure est normalisée sur le signal DLG-1::RFP supposé constant au même stade. Pour cela les signaux GFP et RFP, éclairés au laser argon à 488 nm, sont acquis chacun sur un détecteur hybride en mode comptage de photons (plus adapté qu'un PMT pour une étude quantitative) (Figure 9B, C). Pour limiter au maximum tout biais humain lors de la quantification, celle-ci est faite en aveugle : les images sont renommées par une tierce personne avant la quantification. La mesure est réalisée sur les jonctions entre cellules latérales 1 et 2 (Figure 9B, C d), 2 et 3 (Figure 9B, C e) et 3 et 4 (Figure 9B, C f) sur le signal GFP et RFP. La valeur pour chaque individu est donnée selon la formule suivante :

$$Polarisation = \frac{\frac{Signal\ GFP\ d}{Signal\ RFP\ d} + \frac{Signal\ GFP\ e}{Signal\ GFP\ e} + \frac{Signal\ GFP\ f}{Signal\ GFP\ f}}{3}$$

La quantification de l'orientation de l'actine se fait sur les images acquises au microscope confocal Leica SP8 (détecteur Hybride pour un meilleur rapport signal sur bruit). Celle-ci est réalisée grâce à un programme écrit sur Matlab et développé par l'équipe de Gardel, Tanentzapf et Horne-Badovinac (Cetera et al. 20,14). Après orientation horizontale des cellules sur les images et création d'un masque permettant au programme de sélectionner la zone à analyser, celui-ci découpe les cellules en petites régions d'intérêt, où est calculée une transformée de Fourier afin de déterminer l'orientation préférentielle du signal généré par la sonde se liant à l'actine dans cette zone (Figure 9D).

Les tests de statistiques et représentations graphiques sont faits sous R. Si le test de normalité et d'égalité des variances sont significatifs, on réalise un test de Student, dans le cas contraire, on utilise un test de Wilcoxon. On utilise le code suivant sur les figures : (ns) $p > 0.05$; (*) $0,05 > p > 0,01$; (**) $0,01 > p > 0,001$ et (***) $p < 0,001$.

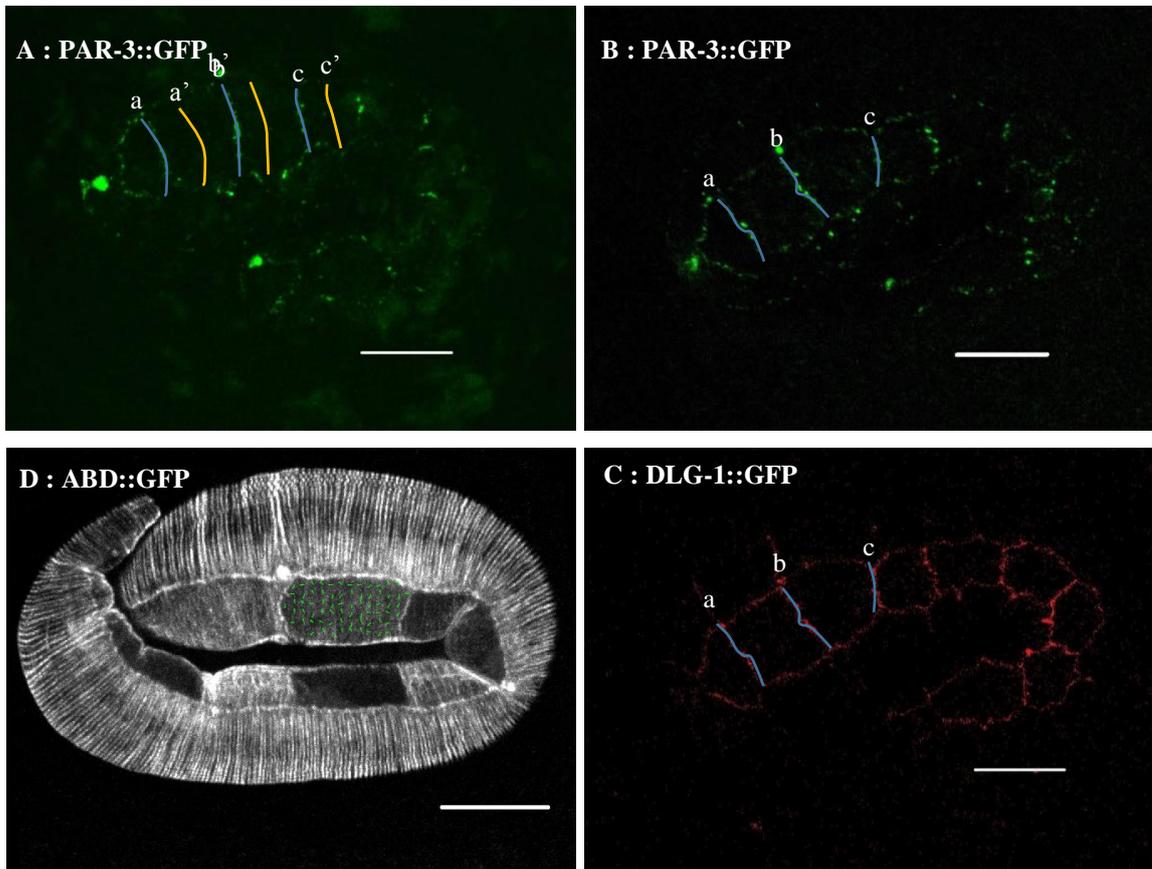


Figure 9 : **Méthodes de mesure sur les images.** (A) Mesure de la polarité de PAR-3 sur les images prises au confocal Leica SPE ; la valeur de chaque individu est donnée par la moyenne du rapport signal membranaire sur signal cytoplasmique pour 3 jonctions. (B, C) Mesure de la polarité de PAR-3 sur les images prises au confocal Leica SP8 ; la valeur de chaque individu est donnée par la moyenne du rapport signal PAR-3::GFP sur DLG-1::RFP sur 3 jonctions. (D) Mesure de l'orientation de l'actine, le programme dessine pour chaque zone de la cellule un vecteur d'orientation préférentielle de l'actine dont l'angle est enregistré dans un tableau. (Barres d'échelle 10 μ m)

III) Résultats

1) Le rôle des contractions musculaires pour la polarisation de PAR-3

Les expériences de déplétion des hémidesmosomes ont démontré que les contractions musculaires contrôlaient la mise en place de la polarisation planaire de PAR-3 (I.5). J'ai cherché à savoir si la polarisation de PAR-3 serait plus importante dans un mutant présentant une hypercontraction musculaire (mutant *unc-105(n506)*).

La variation de signal de PAR-3 n'étant pas visible sur les images et la puissance du laser du microscope Leica SPE pouvant varier sensiblement (ce qui masquerait une éventuelle

variation du signal GFP), j'ai réalisé la quantification absolue selon la méthode décrite au II.6 (avec la normalisation du signal PAR-3::GFP sur le signal DLG-1::RFP).

Le résultat obtenu démontre qu'il n'y a pas de différence significative de la polarisation de PAR-3 pour les embryons *unc-105(n506)* et les embryons contrôles. Cette expérience ne permet pas de confirmer le rôle des contractions musculaires pour la mise en place de la polarisation du module PAR dans les cellules latérales.

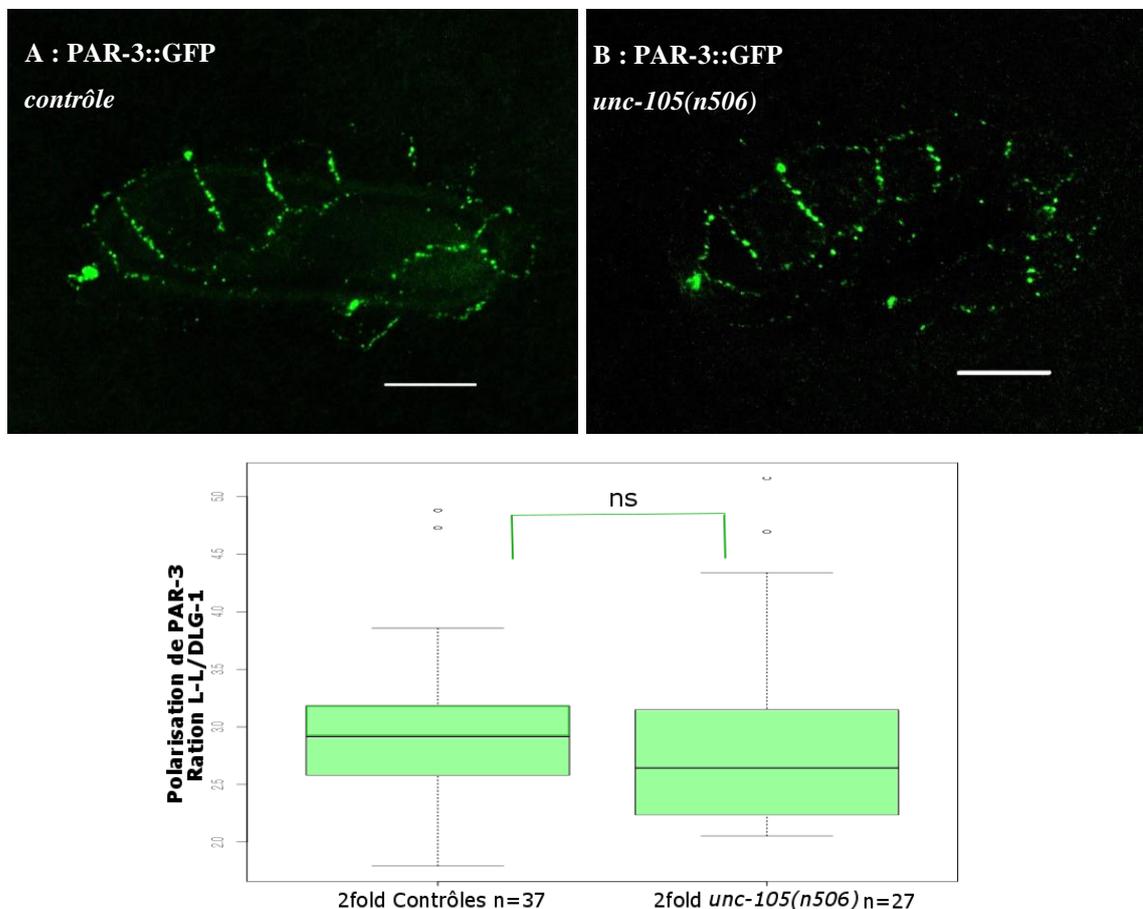


Figure 10 : ***Polarisation de PAR-3 aux jonctions entre cellules latérales en cas de contractions musculaires plus importantes (*unc-105(n506)*) en comparaison avec des individus contrôles.*** On observe des embryons au stade 1,5 (non montré) et 2 fold exprimant le marqueur PAR-3::GFP au confocal Leica SP8 (détecteur hybride), chez des vers *unc-105(n506)*. Aucun changement du signal n'est visible sur les images (A et B). La quantification de la polarisation de PAR-3 observé aux jonctions entre cellules latérales ne démontre pas de différence significative ($p=0,76$) (C et D). Le test statistique est un test de Student. Barres d'échelle $10\mu\text{m}$.

2) Les différents acteurs du module PAR

Nous avons vu dans l'introduction le rôle de la polarisation de PAR-3 pour la polarisation de l'actine et donc la morphogénèse. Le module PAR est composé des 3 protéines

PAR-3, PAR-6 et PKC-3 ; il est donc important d'étudier la polarisation de ces acteurs en cas de déplétion de l'un d'eux.

J'ai cherché à savoir si la déplétion de *par-3* par ARNi affectait la localisation de PAR-6 et PKC-3. Pour cela j'ai réalisé la quantification relative sur les images au confocal Leica SPE.

L'expérience montre une diminution de la localisation de PAR-6 et PKC-3 sur les jonctions latérales-latérales en cas de déplétion de *par-3* (Figure 10B, 11B). On peut donc conclure que l'expression de *par-3* est nécessaire pour la localisation polarisée de PAR-6 et PKC-3.

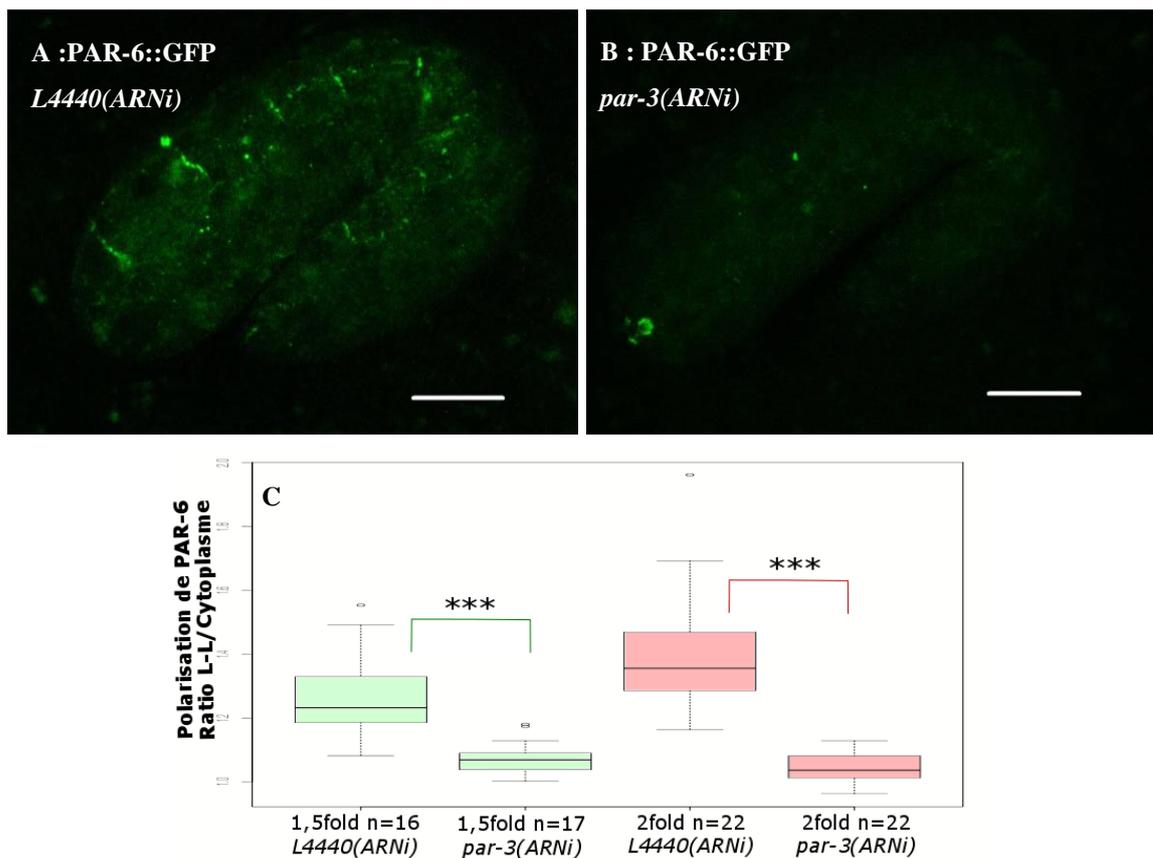


Figure 11 : **Diminution de la polarisation de PAR-6 aux jonctions entre cellules latérales en cas d'ARNi contre *par-3*.** On observe des embryons au stade 1,5 et 2 fold exprimant le marqueur PAR-6::GFP au confocal Leica SPE, après 20h de culture en condition ARNi pour *par-3*. Une diminution de la polarité de PAR-6 est visible sur les images (A et B). Cette baisse significative de la polarisation de PAR-6 est observée aux jonctions entre cellules latérales ($p=6,422 \times 10^{-7}$ et $p=3,716 \times 10^{-12}$ respectivement pour 1,5 fold et 2 fold). On remarque également une plus grande polarisation de PAR-6 au stade 2 fold que 1,5 fold pour les contrôles ($p=0,027$), augmentation de la polarisation non significative pour les PAR-6 ARNi ($p=0,19$) (C). Les tests statistiques sont des tests de Wilcoxon. Barres d'échelle 10 μ m.

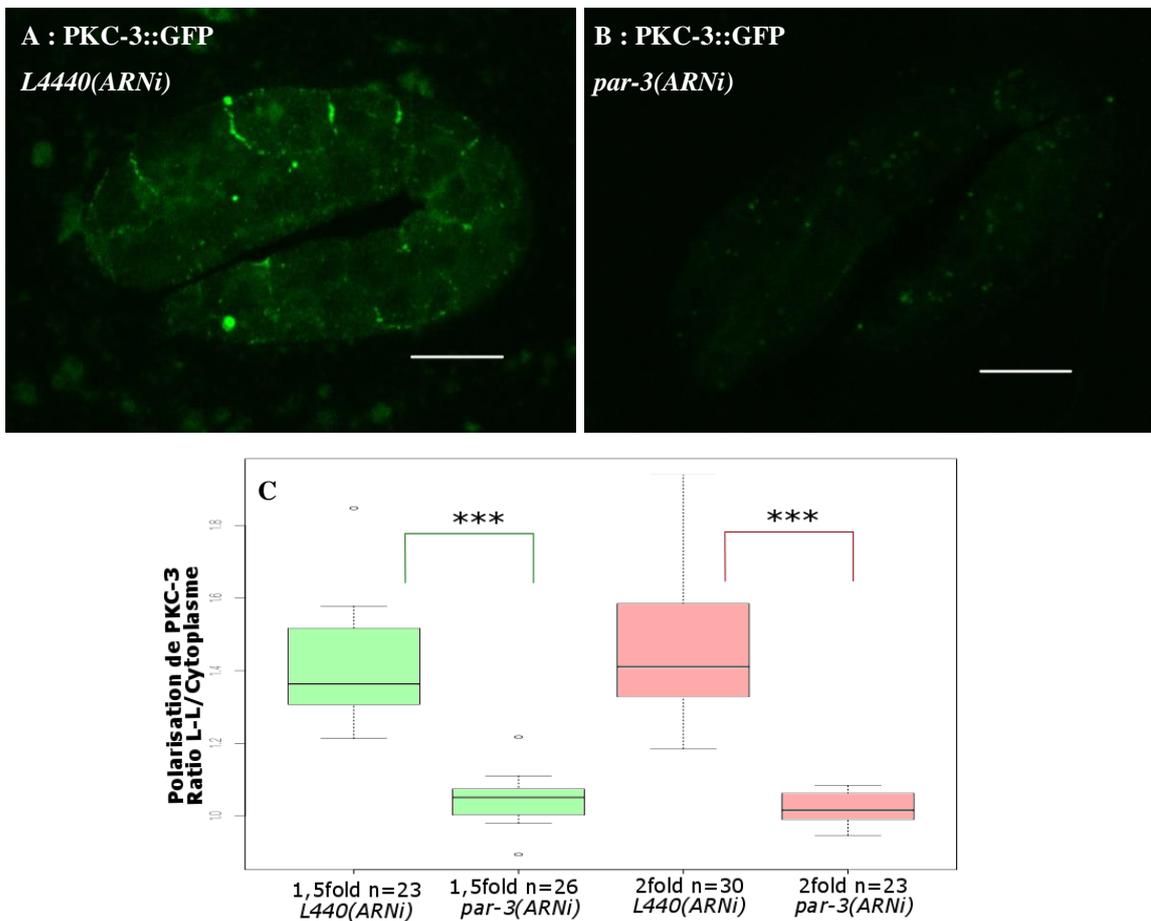


Figure 12 : **Diminution de la polarisation de PKC-3 aux jonctions entre cellules latérales en cas d'ARNi pour *par-3*.** On observe des embryons au stade 1,5 et 2 fold exprimant le marqueur PKC-3::GFP au confocal Leica SPE, après 20h de culture en condition ARNi pour *par-3*. Une diminution de la polarité de PKC-3 est visible sur les images (A et B). Cette baisse significative de la polarisation de PKC-3 est observée aux jonctions entre cellules latérales ($p=2,69 \times 10^{-7}$ et $p=1,28 \times 10^{-4}$ respectivement pour 1,5 fold et 2 fold). Les tests statistiques sont des tests de Wilcoxon. Barres d'échelle 10 μ m.

3) Le rôle de CDC-42 dans la polarisation du module PAR

Nous savons que *cdc-42* interagit dans certains contextes avec le module PAR (Shafaq-Zadah M. et all., 2012). Afin de vérifier s'il y a un contrôle de *cdc-42* sur PAR-3 dans ce contexte j'ai fait une déplétion de *cdc-42* par ARNi. J'ai observé la polarisation de PAR-3 au confocal Leica SPE et j'ai réalisé la quantification relative du signal PAR-3 sur les images.

On observe que la déplétion de *cdc-42* par ARNi amène à une diminution de la localisation de PAR-3 aux membranes entre jonctions de cellules latérales/latérales. On peut voir aussi que cela affecte la dynamique de la polarisation dans le temps : entre le stade 1,5 fold et 2 fold, la polarisation de PAR-3 augmente de façon significative pour les ARNi L4440 (contrôles) ce qui n'est pas le cas pour la déplétion *cdc-42* (Figure 13). Cela démontre donc un rôle de *cdc-42* pour la mise en place de la polarité du module PAR.

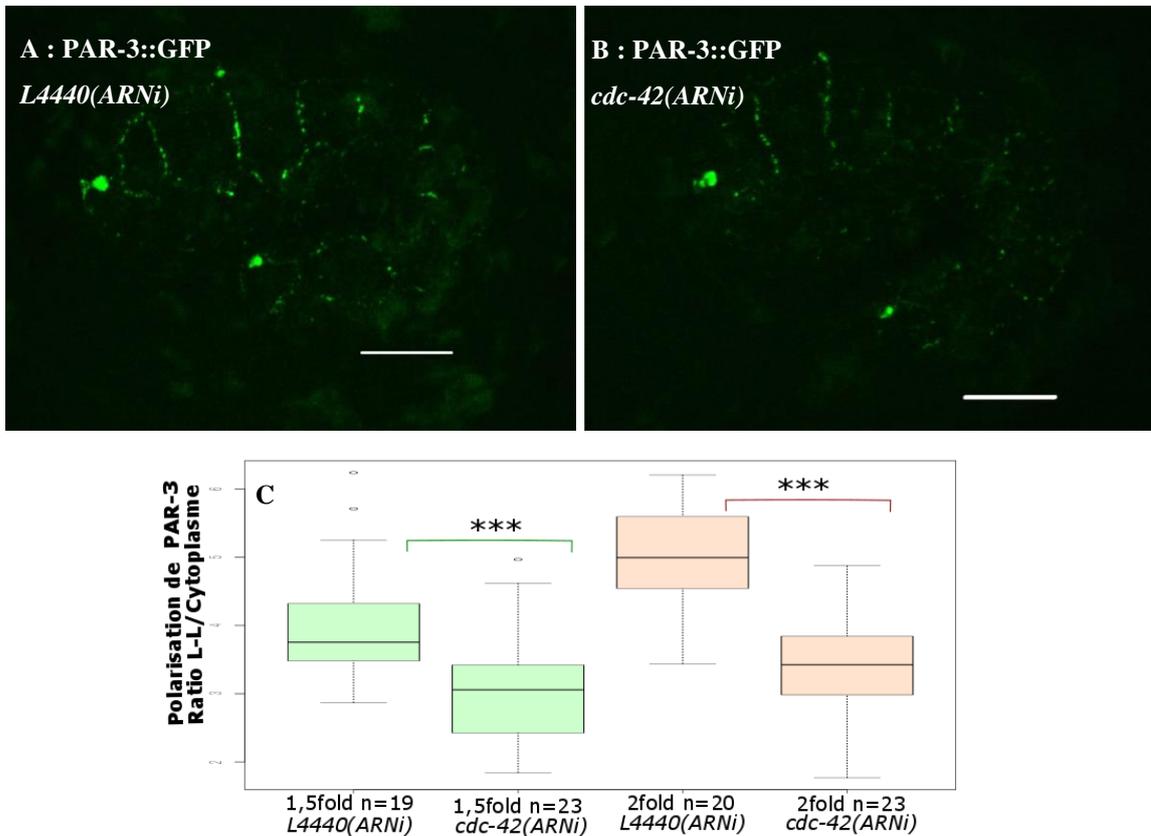


Figure 13 : **Diminution de la polarisation de PAR-3 aux jonctions entre cellules latérales en cas de ARNi CDC-42**. On observe des embryons au stade 1,5 et 2 fold exprimant le marqueur PAR-3::GFP au confocal Leica SPE, après 30h de culture en condition ARNi pour *cdc-42*. Une diminution de la polarité de PAR-3 est visible sur les images (A et B). Cette baisse significative de la polarisation de PAR-3 est observée aux jonctions entre cellules latérales ($p=8,6 \times 10^{-4}$ et $p=1,8 \times 10^{-7}$ respectivement pour 1,5 fold et 2 fold). Les tests statistiques sont des tests de Wilcoxon. Barres d'échelle 10 μ m.

4) Le rôle de CDC-42 dans la polarisation de l'actine

En plus de son interaction avec le module PAR, nous savons que *cdc-42* contrôle ce cytosquelette d'actine (Cowan C. R. et all., 2007). Pour connaître son rôle dans la mise en place de la polarité planaire de l'actine, j'ai réalisé sa déplétion par ARNi. J'ai pu observer l'actine grâce à l'expression de la protéine ABD-GFP (pour Actine Binding Domain GFP, exprimant un domaine de liaison à l'actine lié à une GFP) et j'ai observé la polarisation de l'actine dans les cellules latérales au microscope confocal Leica SP8 (voir matériel et méthodes)

La déplétion de *cdc-42* par ARNi amène à un changement d'organisation de l'actine dans certaines cellules : au lieu d'une organisation selon l'axe dorso-ventral, l'actine se retrouve alors polarisée selon l'axe AP (Figure 14A, B). La quantification de la polarisation de l'actine démontre une polarisation préférentielle selon l'axe AP et non DV (Figure 14C). Ce résultat démontre donc un rôle de CDC-42 dans la mise en place de la polarisation de l'actine.

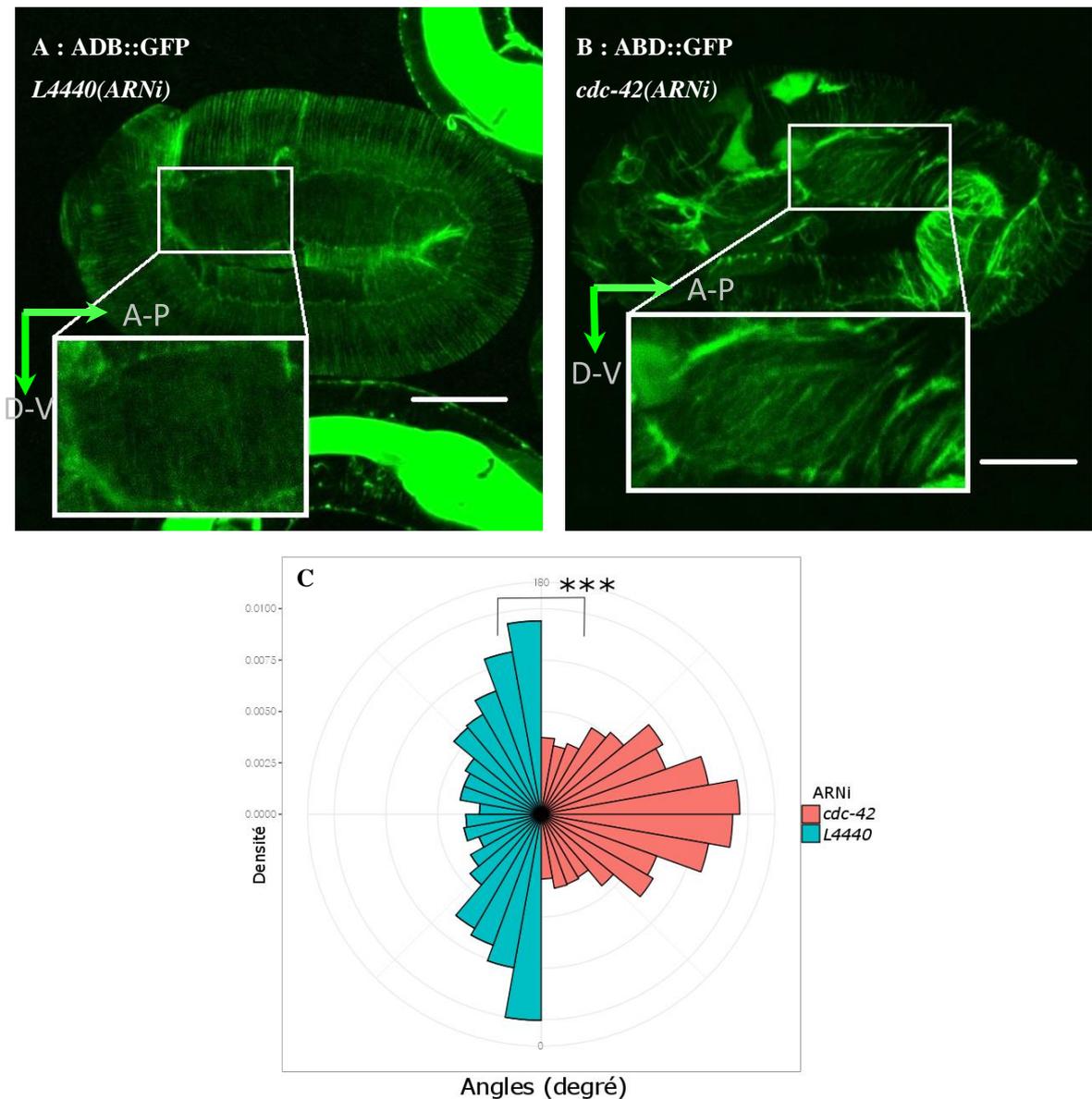


Figure 14 : **Perte de la polarisation DV de l'actine dans les cellules latérales en cas d'ARNi CDC-42.** On observe des embryons au stade 2 fold exprimant le marqueur *ABD::GFP* au confocal Leica SP8 (détecteur hybride), après 22h de culture en condition ARNi pour *cdc-42*. L'actine normalement polarisée dorso-ventralement (A) montre un défaut de polarisation (B) qui correspond à un changement d'angle significatif ($p=2 \times 10^{-16}$) dans l'axe AP (C). Mesure réalisée sur 29 individus (2595 mesures dans 49 cellules) ARNi et 26 individus contrôles (2742 mesures dans 40 cellules). Test statistique d'ANOVA à deux facteurs (ARNi et embryons) sur la totalité des données normalisées de 0 à 90°. Barres d'échelle 10 μ m.

IV) Discussion

Nous avons cherché à savoir comment s'opère le contrôle de la polarité planaire dans les cellules latérales chez *C. elegans* lors de la morphogénèse. Pour cela nous avons examiné les interactions génétiques entre PAR-3, PAR-6 et PKC-3 pour leur localisation ainsi qu'un

contrôle de CDC-42 sur PAR-3 ; enfin nous nous sommes demandé si CDC-42 contrôlait aussi le cytosquelette d'actine dans le contexte de l'élongation embryonnaire.

Les expériences m'ont permis de démontrer que PAR-6 et PKC-3 dépendent de PAR-3 pour la mise en place de la polarisation planaire. En effet la déplétion de *par-3* amène à une dépolarisation de ces deux protéines. Afin de savoir si le module de polarité apical PAR fonctionne comme un complexe dans ce contexte de polarité planaire, il faudra examiner si PAR-6 et PKC-3 sont requises pour la localisation de l'ensemble du module. Pour cela il faudra réaliser des pertes de fonction de PAR-6 et PKC-3 grâce à l'ARNi ou en utilisant la souche *par-3::gfp dlx-1::rfp pkc-3(ne4246)* générée pendant mon stage ; le mutant *pkc-3(ne4246)* est thermosensible et permet donc d'inactiver la protéine à un moment précis par simple choc thermique. On pourra chercher ensuite à savoir si l'ensemble du module est également requis pour l'organisation de l'actine. Enfin il faudrait réaliser des expériences d'interaction in vivo, par transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) ou complémentation de fluorescence (BiFC) pour savoir si ces protéines interagissent physiquement.

J'ai aussi démontré le rôle de CDC-42 pour la mise en place de la polarité planaire de PAR-3 qui contrôle elle-même la polarité de l'actine. Il faudrait donc savoir si la déplétion de *cdc-42* entraîne une mauvaise polarisation de l'actine indirectement à cause de la diminution de la polarité de PAR-3 ou si CDC-42 joue directement sur la polarisation de l'actine. Pour cela il faudrait notamment disposer d'une souche présentant un marqueur de CDC-42 détectable lorsque la protéine est activée (c'est-à-dire liée au GTP). Cela permettrait d'étudier son activité en particulier dans un contexte de déplétion des protéines du module PAR.

On peut émettre une hypothèse au regard des résultats obtenus lors de la déplétion de *cdc-42* : la polarisation de PAR-3 est diminuée mais ne disparaît pas complètement aux jonctions, alors que l'orientation de l'actine est fortement impactée. Cela suggère un contrôle direct de CDC-42 sur le cytosquelette d'actine, même s'il agit en parallèle du module PAR ; l'autre hypothèse étant que CDC-42 contrôle le module PAR, contrôlant à son tour l'actine.

Une fois le rôle de CDC-42 mieux compris, il faudrait s'intéresser à la manière dont son activité est contrôlée dans ce contexte. C'est-à-dire identifier les voies d'activation (par les GEF) et de répression de son activité (par les GAP). En fonction des interacteurs de CDC-42 dans ce contexte, cela permettrait de savoir si CDC-42 agit directement sur l'actine ou sur la localisation du module PAR.

Nous savons que le signal pour la polarisation de PAR-3 dans les cellules latérales est d'origine musculaire. Or les muscles sont situés sous l'épiderme dorso-ventral et sont reliés via les hémidesmosomes. On peut donc se demander comment s'opère la transmission du signal mécanique depuis les muscles jusqu'aux cellules latérales. Une solution simple serait que le signal soit différent au niveau des jonctions entre cellules latérales et entre cellules latérales et dorso-ventrales. Deux voies sont possibles : la première est une voie biochimique, la seconde est une propagation directe du signal mécanique.

La voie biochimique peut se faire via interaction de protéines exprimées au niveau des jonctions, à la membrane des cellules de l'épiderme dorso-ventral et protéines de l'épiderme latéral. Cette interaction provoquerait alors l'exclusion et la relocalisation du module PAR qui ne se retrouverait plus qu'aux jonctions entre cellules latérales. Une autre possibilité serait une protéine sécrétée par l'épiderme dorso-ventral interagissant avec une protéine de la membrane des cellules latérales. Des résultats de l'équipe montrent que la voie Wnt pourrait être impliquée dans ce contexte.

Le signal peut aussi être propagé de façon mécanique via les liens entre cellules latérales et dorso-ventrales. Par exemple via les jonctions cellulaires formées par la cadhérine ou la matrice extracellulaire entourant l'embryon. Pour tester ces hypothèses il faudrait procéder à des expériences de déplétion des gènes impliqués dans la production de ces structures.

Une fois ces derniers résultats obtenus, cette étude permettra de mieux comprendre les différents acteurs et leurs interactions permettant la morphogenèse depuis la transduction d'un signal mécanique provenant des muscles situés sous l'épiderme dorso-ventral jusqu'à la polarité planaire de l'actine dans les cellules de l'épiderme latéral.

Le rôle d'un signal mécanique dans la polarité planaire d'un tissu épithélial avait déjà été identifiée au cours de la morphogenèse dans l'aile de la drosophile (Aigouy B. et al., 2010). Par exemple les contractions au niveau de la charnière de l'aile provoquent une orientation des divisions cellulaires et des réarrangements amenant à une réorientation de la PCP selon un axe proximo-distale (Yih W. et al., 2016). Néanmoins la voie présentée ici est particulière. En effet ces études portaient sur un seul tissu à la fois émetteur et récepteur du signal mécanique. Or dans le contexte de la morphogenèse embryonnaire de *C. elegans* le signal mécanique est émis par les muscles et transmis à deux types cellulaires différents que sont les cellules de l'épiderme dorso-ventral et les cellules de l'épiderme latérales.

Références Bibliographiques

- Aigouy B., Farhadifar R., Staple D.B., Sagner A., Röper J.C., Jülicher F. & Eaton S., 2010. *Cell flow reorients the axis of planar polarity in the wing epithelium of Drosophila*. 142:773-86
- Brenner S. 1974. *The genetic of Caenorhabditis elegans*. Genetic 77:71-94
- Cowan C. R. & Hyman A. A. 2007. *Acto-myosin reorganization and PAR polarity in C. elegans*. Development 134:1035-1043
- Fernandez-Sanchez M. E., Brunet T., Röper J. C. & Farge E., 2015. *Mechanotransduction's Impact on Animal Development Evolution, and Tumorigenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol 31:373-397
- Gally C., Wissler F., Zahreddine H., Quitin S. Landmann F. & Labouesse M., 2009. *Myosin II regulation during C. elegans embryonic elongation: LET-502/ROCK, MRCK-1 and PAK-1, three kinases with different roles*. Development 136:3109-31197
- Gillard G., Nicolle O., Pinot M., Prigent S. & Michaux G., *Coordinated morphogenesis through tension-induced planar polarity*. En préparation
- Kamath R. S. & Ahringer J., 2003. *Genome-wide RNAi screening in Caenorhabditis elegans*. Methods 30:313–321
- Maillet M. 1990. *Biologie Cellulaire*. Ed Masson coll Abreges 1990 5e edition p211-213
- Montcouquiol M., Rachel R. A., Lanford P. J., Copeland N. G., Nancy A. J. & Kelley M. W. 2003. *Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals*. Nature 423:173-177
- Peycru P., Augère B. & Baehr J.-C. *Biologie – Tout-en-un BCPST – Ire année*. Ed Dunot coll J'intègre, 3^e Ed (2010) p267-277.
- Rodriguez-Boulan E. & Macara I. E. 2014 *Organization and execution of the epithelial polarity programme*. Nat Rev Mol Cell Biol 15(4):225–242.
- Shafaq-Zadah M., Brocard L., Solari F., & Michaux G. 2012. *AP-1 is required for the maintenance of apico-basal polarity in the C. elegans intestine*. Development 139:2061-2070.
- Vuong-Brender T. T.K., Yang X. & Labouesse M. 2016. *C. elegans embryonic morphogenesis*. Current Topics in Developmental Biology, Volume 116:597-616

- Vuong-Brender T. T.K., Ben Amar M., Pontabry J. & Labouesse M., 2017. *The interplay of stiffness and force anisotropies 1 drive embryo elongation*. eLife 2017 6:e23866
- Yih W. & Devenport D., 2016. *Planar cell polarity: global inputs establishing cellular asymmetry*. Current Opinion in Cell Biology 44:110-116
- Zhang H., Landmann F., Zahreddine H., Rodriguez D., Koch M., & Labouesse M. 2011. *A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis*. Nature 471:99-103
- Zhang H. & Labouesse M. 2012. *Signaling through mechanical inputs – a coordinated process*. Journal of Cell Science 125:3039–3049

Résumé

Introduction

In most biological tissue cells are polarized. It means that they organize their plasma membrane, cytoskeleton and intracellular components along an axis linked to their function. For instance epithelial cells are polarized in the apico-basal axis. In these cells, another polarization axis can be found in the apical membrane plane; this polarization axis is called planar cell polarity (PCP). The origin of PCP is usually due to a directional signal along various tissue axis (proximo-distal, antero-posterior-dorso-ventral etc) which leads to an asymmetrical distribution of specific proteins.

It has been found by the team that PCP is important for *C. elegans* embryo elongation during the morphogenesis. *C. elegans*' elongation occurs without cell divisions, migration nor cell rearrangement; the only observed phenotype is that lateral epidermal cells change their shape, elongating in the antero-posterior axis, triggering the elongation of the whole embryo. In these cells actin gets polarized in the dorso-ventral axis. This polarization, and actin contractions, leads to a narrowing of the embryo in the dorso-ventral axis and an elongation in the antero-posterior axis. Polarization of PAR-3, which can only be found at the junction between lateral cells but not on the junctions with the rest of the epidermis, is necessary for the setting of the PCP in lateral epidermis cells, as the depletion of *par-3* leads to a disorganization of the actin. It was shown by the team that PAR-3 planar polarization is induced by muscle contractions. PAR-3, together with PAR-6 and PKC-3, form the apical PAR module which is usually essential for apico-basal polarity. But during *C. elegans* embryonic morphogenesis it is therefore also essential for PCP. Another protein often associated with the apical PAR module is the small GTPase CDC-42. This factor can interact with the PAR module in other contexts and often controls actin cytoskeleton. I decided to investigate the role of PAR-3 and CDC-42 during planar polarity establishment in lateral epidermal cells.

Material and methods

To observe the different proteins in this study, I used *C. elegans* embryos expressing fluorescent markers fused to component of the PAR module (PAR-3::GFP, PAR-6::GFP and PKC-3::GFP) or to an actin binding domain (ABD::GFP). Those markers were observed using confocal Leica SPE and SP8 microscopes. Quantifications was made using ImageJ for PAR localization and a program on MatLab for actin polarization. PAR-3::GFP, PAR-6::GFP and PKC-3::GFP strains have been generated by introducing the GFP at the endogenous locus using the CRISPR/Cas9 technique.

To study the role of *par-3* and *cdc-42* genes I used feeding RNA interference technique. Worms are fed by bacteria expressing a double strand RNA which is not digested by worms. I made quantifications using ImageJ and a little program on Matlab (Cetera et al. 2014) to quantify actin orientation.

Results

I first wanted to confirm the role of muscle contraction for PAR polarization. To do that I used a mutant (*unc-105(n506)*) with higher muscle contraction and I measured the PAR-3 planar localization. However I did not observe any difference between control and mutant embryos, suggesting that muscle hypercontraction do not induce stronger planar polarity of PAR-3.

To understand the interactions between the different proteins of the apical PAR module, I performed a depletion of *par-3* by RNAi in worms expressing PKC-3::GFP and PAR-6::GFP and observed their localization. The embryos showed a decrease of PAR-6 and PKC-3 polarization in lateral cells, whereas those proteins are normally found at the junctions between lateral cells. That shows the role of PAR-3 for the planar polarized localization of PAR-6 and PKC-3.

I then performed depletion of *cdc-42* by RNAi in embryo expressing PAR-3::GFP. The depletion leads to a decrease of PAR-3 polarization in lateral cells of the embryos. That suggests that CDC-42 is required for the polarization of PAR-3.

Finally, to know if CDC-42 controls actin in this context, I performed a depletion of *cdc-42* by RNAi in worms expressing ABD::GFP. The actin became polarized in the antero-posterior axis in some laterals cells, whereas it is normally polarized in the dorso-ventral axis. I concluded that CDC-42 is required to establish actin planar polarity.

Conclusion

I have shown that PAR-3 is required for the planar localization of PAR-6 and PKC-3 and that CDC-42 controls the planar polarity of PAR-3 and actin. These results suggest that PAR-3, PAR-6, PKC-3 and CDC-42 interact to control the planar polarity of actin and therefore *C. elegans* embryonic morphogenesis. To better understand the function of these proteins future work will be necessary; for instance we do not know if PAR-6 and PKC-3 are also required for actin planar polarity. Furthermore, because CDC-42 can control both PAR-3 and actin organization, it will be interesting to understand whether CDC-42 controls actin directly or indirectly.

	Diplôme : Ingénieur Agronome Spécialité : SCMV Sciences Cellulaire et Moléculaire du Vivant Spécialisation / option : Enseignant référent : Jean-Marc FRASLIN
Auteur(s) : Thibault BRUGIERE Date de naissance* : 12/10/1994	Organisme d'accueil : IGDR Adresse : 2 avenue du Pr Léon Bernard
Nb pages : 23 Annexe(s) : 0	35043 Rennes Cedex
Année de soutenance : 2017	Maître de stage : Grégoire MICHAUX
Titre français : Contrôle de la polarité planaire pendant la morphogenèse chez <i>C. Elegans</i>	
Titre anglais : Control of the Planar Cell Polarity in the context of morphogenesis of <i>C. Elegans</i>	
Résumé (1600 caractères maximum) : La polarité cellulaire planaire (PCP) correspond à une répartition asymétrique de protéines spécifiques dans le plan de la membrane apicale des cellules épithéliales. Lors de la morphogenèse embryonnaire de <i>C. elegans</i> , on observe la mise en place d'une PCP du module de polarité apical PAR (PAR-3, PAR-6 et PKC-3). Cette PCP est importante dans les cellules latérales de l'épiderme dans la mesure où elle contrôle l'orientation de câbles d'actine polarisés selon l'axe dorso-ventral. Cette polarisation planaire de l'actine est nécessaire pour l'allongement du ver par rétrécissement selon l'axe dorso-ventral et donc la morphogenèse embryonnaire. J'ai cherché à identifier la fonction de PAR-3 et de la petite GTPase CDC-42, un autre membre du module PAR apical, dans ce contexte. J'ai montré que des embryons dépletés de <i>par-3</i> montrent une diminution de la polarisation planaire de PAR-6 et PKC-3 suggérant que ces facteurs sont dépendants de PAR-3 pour leur localisation. De plus des embryons dépletés de <i>cdc-42</i> montrent une diminution de la polarisation de PAR-3 et une désorganisation de l'actine dans l'épiderme latérale. Ces résultats suggèrent que CDC-42 interagit avec le module PAR apical pour contrôler l'organisation planaire de l'actine et donc la morphogenèse embryonnaire.	
Abstract (1600 caractères maximum) : Planar cell polarity (PCP) corresponds to an asymmetrical distribution of specific proteins in the apical membrane plane of epithelial cells. During embryonic morphogenesis of <i>C. elegans</i> , we have observed the establishment of a PCP of the apical PAR module (PAR-3, PAR-6 and PKC-3). This PCP is important in lateral epidermal cells because it controls the orientation of actin cables polarized in the dorso-ventral axis. This planar polarization of actin is required for the elongation of the worm by narrowing in the dorso-ventral axis, and therefore for embryonic morphogenesis. I investigated the function of PAR-3 and of the small GTPase CDC-42, an other component of the apical PAR module, in that context. I found that embryos depleted of <i>par-3</i> showed a decrease of PAR-6 and PKC-3 planar polarization, suggesting that these factors require PAR-3 for their localization. Furthermore depletion of <i>cdc-42</i> leads to a decrease of PAR-3 polarization and a disorganization of actin in the lateral epidermis. These results suggest that CDC-42 interacts with the apical PAR module to control planar organization of actin and therefore embryonic morphogenesis.	
Mots-clés : Mécanotransduction, Protéines PAR, Polarisation de l'Actine, Epiderme, Elongation	
Key Words: Mecanotransduction, PAR Protein, Actin Polarization, Epidermis, Elongation	

* Élément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires