

Université de Montréal

Identification de régulateurs de la voie de signalisation du
suppresseur tumoral PAR-4/LKB1 chez *C. elegans*

par
Catherine Descoteaux

Biologie moléculaire, Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Biologie moléculaire, option générale avec mémoire

13 juillet 2015

© Catherine Descoteaux, 2015

RÉSUMÉ

Le gène *par-4* code pour une kinase à sérine/thréonine très conservée qui régule la polarisation précoce et la division cellulaire asymétrique de l'embryon de *C. elegans*. Une mutation de *par-4* entraîne la létalité embryonnaire en perturbant trois processus: la ségrégation asymétrique des déterminants cellulaires, la régulation asynchrone de la progression du cycle cellulaire et la contractilité du réseau d'actomyosine. Pour identifier des régulateurs des voies de signalisation de PAR-4, nous avons procédé à un criblage pour des suppresseurs de la létalité embryonnaire associée à une mutation de *par-4*. Nous avons identifié 6 gènes qui codent pour des homologues conservés avec des activités définies telles que la phosphorylation, l'ubiquitination, la protéolyse et l'échafaudage. En employant l'imagerie quantitative pour suivre des événements cellulaires dépendants de PAR-4, nous avons déterminé quels processus sont contrôlés par chaque suppresseur durant le développement embryonnaire de *C. elegans*. Des analyses moléculaires de ces suppresseurs ont révélé des détails sur le mécanisme par lequel PAR-4 régule la polarisation cellulaire et promeut la division cellulaire asymétrique.

Mots clés :

PAR-4/LKB1, Division cellulaire asymétrique, Syndrome de Peutz-Jeghers, Régulation du cycle cellulaire, *Caenorhabditis elegans*, Embryogénèse, Signalisation cellulaire, Microscopie, Analyse quantitative d'images, Polarisation cellulaire

SUMMARY

The gene *lkb1* codes for a highly conserved serine/threonine kinase. The orthologue of *lkb1* in the nematode *Caenorhabditis elegans*, termed *par-4*, regulates early polarization and asymmetric cell division in the embryo. A mutation in *par-4* causes embryonic lethality by perturbing three main cellular processes: asymmetric segregation of cell fate determinants, asynchronous regulation of cell cycle progression and contractility of the actomyosin network. To identify regulators of the PAR-4/LKB1-dependent pathways, we performed a screen for suppressors of the embryonic lethality associated with a mutation in *par-4*. We identified 6 genes that have conserved homologs with defined activities including protein phosphorylation, ubiquitination, proteolysis and scaffolding. We used quantitative imaging of specific PAR-4-dependent cellular events to determine which of these are controlled by each suppressor during early *C. elegans* embryonic development. Molecular analysis of these suppressors revealed details on the mechanism through which PAR-4 regulates cell polarization and promotes asymmetric cell division.

Key words:

PAR-4/LKB1, Asymmetric cell division, Peutz-Jeghers Syndrome, Cell cycle regulation, *Caenorhabditis elegans*, Embryogenesis, Cell signalling, Microscopy, Quantitative imaging, Cell polarization

TABLES DES MATIÈRES

Résumé.....	i
Summary	ii
Tables des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Dédicace	xiii
Remerciements	xv
CHAPITRE 1	1
Revue de littérature	3
1. L'organisme modèle <i>C. elegans</i>	3
2. Le cycle cellulaire	5
2.1. Description	5
2.2. L'interphase.....	7
2.2.1. Machinerie de réplication de l'ADN	7
2.2.2. Points de contrôle	7
2.3. La division cellulaire (Phase M).....	8
2.3.1. Description.....	8
2.3.2. La mitose.....	8
2.3.3. La méiose.....	8
2.4. La division cellulaire asymétrique.....	10
3. La division cellulaire asymétrique chez <i>C. elegans</i>	12
3.1. Contraction du cortex.....	14
3.2. Localisation des centrosomes.....	18
3.3. Ségrégation des déterminants cellulaires.....	18
3.4. Asynchronie des cycles cellulaires.....	19
3.4.1. Modifications au cycle cellulaire dans P1.....	19
3.4.2. Modifications au cycle cellulaire dans AB.....	20
3.5. Les protéines PAR et la division cellulaire asymétrique	21
3.5.1. Distribution.....	21
3.5.2. Fonctions	22

3.5.3.	PAR-1/MARK	23
3.5.4.	PAR-4/LKB1	23
4.	Criblage pangénomique de suppresseurs de létalité de mutants <i>par-4</i>	27
4.1.	Interférence par ARNs (ARNi)	27
4.2.	Résultats	28
4.2.1.	Les kinases RSKN-1 et MPK-1	28
4.2.2.	L'immunophiline FKB-6	28
4.2.3.	La proprotéine convertase AEX-5	29
4.2.4.	L'E3 ubiquitine ligase UBR-1	31
4.2.5.	La protéine de liaison à la topoisomérase II MUS-101	32
4.2.6.	La protéine d'échafaudage ANI-2	32
	Rationalisation du projet	35
	Hypothèse.....	36
	Objectifs de recherche.....	37
	CHAPITRE 2	39
	Article 1 : PAR-4/LKB1 regulates DNA replication during asynchronous division of the early <i>C. elegans</i> embryo	41
	Abstract	43
	Introduction.....	44
	Results and discussion	45
	The function of PAR-4 in cell cycle regulation relies on a MUS-101-dependent activity	45
	MUS-101 suppresses <i>par-4</i> cell cycle timing defects through its function in DNA replication	47
	PAR-4 asymmetrically regulates DNA replication.....	48
	PAR-1 regulates DNA replication.....	51
	A model for the regulation of asynchronous cell division	52
	Materials and methods.....	53
	Strains and alleles	53
	RNAi-mediated depletions	54
	Time-lapse imaging of embryonic development.....	55
	Immunofluorescence	56
	Quantification of DNA replication dynamics.....	57

Online supplemental material.....	58
Acknowledgements	59
References.....	60
Figures	65
Tables.....	68
Supplemental Figures.....	69
Supplemental Tables.....	75
CHAPITRE 3	77
Article 2: An RNAi screen for suppressors of <i>par-4</i> embryonic lethality in <i>C. elegans</i> uncovers new potential regulators of polarity establishment.....	79
Abstract.....	80
Introduction.....	81
Material and Methods.....	83
Strains	83
RNA interference (RNAi) assays and suppressor screen.....	83
Image acquisition and quantitative image analysis	83
Lethality assays	84
Phylogenetic tree.....	84
Results and Discussion.....	86
A screen for suppressors of <i>par-4(it57ts)</i> embryonic lethality uncovers 7 genes.	86
The lethality suppressors act in the three <i>par-4</i> -dependent pathways in the embryo.....	88
<i>mpk-1</i> and <i>rskn-1</i> (RNAi) suppress partially the <i>par-1</i> phenotypes of PIE-1::GFP mislocalization and synchrony	90
AEX-5 functions in embryonic development independently of its activity in the intestine.....	91
References	93
Tables.....	97
Figures.....	98
Supplemental figures.....	104
CHAPITRE 4	107
Discussion	109
1. Récapitulation.....	109
2. <i>par-4</i> , la régulation des cycles cellulaires d'AB et P1 et la ségrégation des déterminants cellulaires	110

3. <i>par-4</i> et la contractilité des filaments d'actomyosine corticaux	112
3.1. La proprotéine convertase AEX-5	112
3.2. L'E3 ubiquitine ligase UBR-1	114
3.3. L'immunophiline FKB-6	115
3.4. Les kinases RSKN-1 et MPK-1	116
Conclusion : <i>par-4</i> et la division cellulaire asymétrique	117
Index analytique	121
BIBLIOGRAPHIE	xvii

LISTE DES TABLEAUX

TABLE 2.I. MUTATIONS IN <i>MUS-101</i> SUPPRESS <i>PAR-4</i> LETHALITY	68
TABLE 2.SI. DNA REPLICATION INITIATION HOMOLOGUES IN VARIOUS SPECIES.....	75
TABLE 3.I. STRAINS USED IN THIS PAPER.....	97

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1. C. ELEGANS EST UN ORGANISME MODÈLE COURAMMENT UTILISÉ POUR DES ANALYSES GÉNÉTIQUES [3].....	4
FIGURE 1.2. ÉTAPES DU CYCLE CELLULAIRE [6]	6
FIGURE 1.3. COMPARAISON DES ÉTAPES DES DEUX TYPES DE DIVISION CELLULAIRE [17].	10
FIGURE 1.4. DIVISION CELLULAIRE ASYMÉTRIQUE DES CELLULES SOUCHES [24]	12
FIGURE 1.5. PHASES DE LA POLARITÉ EMBRYONNAIRE [25].....	14
FIGURE 1.6. CONTRACTILITÉ DU CORTEX DE C. ELEGANS [47].....	17
FIGURE 1.7. RÔLE DE PAR-4 DANS L'ÉTABLISSEMENT DE LA POLARITÉ CELLULAIRE DE L'EMBRYON PRÉCOCE DE C. ELEGANS	26
FIGURE 1.8. VOIE DE SIGNALISATION D'AEX-5 DANS LA RÉGULATION DE LA DÉFÉCATION.....	30
FIGURE 1.9. DOMAINES FONCTIONNELS DE L'ANILLINE [202].....	33
FIGURE 1.10. VOIES DE SIGNALISATION DE PAR-4/LKB1 CHEZ C.ELEGANS	36
FIGURE 2.1. DEPLETION OF MUS-101 LENGTHENS THE DURATION OF ASYNCHRONOUS DIVISION AND OF P1 BLASTOMERE S PHASE IN PAR-4(IT47TS) MUTANTS.	65
FIGURE 2.2. DEPLETING REGULATORS OF DNA REPLICATION INITIATION SUPPRESSES THE ASYNCHRONY DURATION DEFECT OF PAR-4 AND PAR-1 EMBRYOS, INDEPENDENTLY OF CHECKPOINT ACTIVITY.	66
FIGURE 2.3. PAR-4 AND PAR-1 ASYMMETRICALLY REGULATE THE INITIATION OF DNA REPLICATION AT THE TWO-CELL STAGE.	67
FIGURE 2.S1. DEPLETION OF MUS-101 DOES NOT SUPPRESS THE CELL FATE DETERMINANT LOCALIZATION AND ACTOMYOSIN CONTRACTILITY DEFECTS OF PAR-4 MUTANTS.	70
FIGURE 2.S2. PAR-4 REGULATES THE INITIATION OF DNA REPLICATION.....	71
FIGURE 2.S3. MUS-101 AND PSF-3 ARE DISTRIBUTED SYMMETRICALLY IN TWO-CELL STAGE EMBRYOS.....	74
FIGURE 3.1. GENOME-WIDE RNAi SCREEN FOR SUPPRESSORS OF EMBRYONIC LETHALITY IN PAR-4 MUTANTS	98
FIGURE 3.2. THE DEPLETION OF MPK-1, RSKN-1, UBR-1, FKB-6 AND AEX-5 RESTORES THE ACTOMYOSIN CONTRACTILITY IN A PAR-4 MUTANT	99
FIGURE 3.3. THE DEPLETION OF MPK-1 AND RSKN-1 PARTIALLY RESTORES THE SEGREGATION OF THE CELL FATE DETERMINANT PIE-1::GFP IN PAR-4 MUTANTS.	100
FIGURE 3.4. THE DEPLETION OF MPK-1 AND RSKN-1 PARTIALLY RESTORES THE ASYNCHRONY BETWEEN AB AND P1 IN PAR-4 AND PAR-1 MUTANTS.	101
FIGURE 3.5. THE DEPLETION OF MPK-1 AND RSKN-1 PARTIALLY RESTORES THE SEGREGATION OF THE CELL FATE DETERMINANT PIE-1::GFP AND THE ASYNCHRONY BETWEEN AB AND P1 IN PAR-1 MUTANTS.	102
FIGURE 3.6. AEX-5 AFFECTS EMBRYONIC LETHALITY BY INTERACTING WITH PAR-4, BUT NOT FROM THE INTESTINE.....	103
FIGURE 3.S1. ASYNCHRONY OF GENETIC STRAINS.....	104
FIGURE S2. PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE PCs	105
FIGURE 4.1. VOIES DE SIGNALISATION DE PAR-4.....	117

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN, DNA	Acide désoxyribonucléique
Aboc	<i>Anterior BODy Contraction</i>
ADP	Adénosine diphosphate
AEX	<i>Aboc and exp defective</i>
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	AMP kinase
ARN	Acide ribonucléique
ARNdb	ARN double brin
ARNi, RNAi	Interférence par ARN
ARNlnc	Longs ARN non codants
ARNm	ARN messenger
ARNsi	<i>Small interfering RNA</i>
ATP	Adénosine triphosphate
bp	<i>base pairs</i>
CDC	<i>Cell division cycle</i>
CDK	<i>Cyclin-dependant kinase</i>
CHK	<i>Checkpoint kinase</i>
Ctl	Contrôle
CYK-4	<i>Cytokinesis defect-4</i>
DIC	<i>Differential interference contrast</i>
DUB	Enzyme déubiquitinatrice
Exp	Expulsion
FKB-6	<i>FK506-Binding protein-6</i>
GAG	Glycosaminoglycanes
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
GSC	<i>Germinal stem cells</i>
GTP	Guanosine triphosphate
GTPase	<i>Guanosine triphosphate hydrolase</i>
LKB1	<i>Liver kinase B1</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MM	Masse moléculaire
MO25	<i>Mouse protein</i>
MPK-1	MAP kinase-1
ms	millisecondes
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycine</i>
NEBD	<i>Nuclear envelope breakdown</i>
NLP	<i>Neuropeptide-like protein</i>

NMY-2	<i>Non-muscular myosin-2</i>
ORC	<i>Origin of replication complex</i>
PAR	<i>Partitioning protein</i>
Pboc	<i>Posterior Body Contraction</i>
PC	<i>Proprotéine convertase</i>
PCNA, PCN-1	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PIE-1	<i>Pharynx and intestine in excess-1</i>
PKC-3	<i>Protéine kinase C-3</i>
PLK-1	<i>Polo-like kinase-1</i>
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNAPII	<i>ARN polymerase II</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
RSKN-1	<i>RSK-pNinety (RSK-p90 kinase) homolog-1</i>
SNAP-25	<i>synaptosomal-associated protein-25</i>
SNARE	<i>SNAP receptor</i>
STRD-1	<i>Yeast STE20 Related Adaptor protein homolog-1</i>
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
TOPBP1	<i>Topoisomerase-binding protein-1</i>
TPR	<i>tétratricopeptide</i>
TPR	<i>Tétratricopeptide</i>
WT	<i>Wild type</i>
µm	<i>micromètre</i>

« N'est-ce pas dans le rêve cependant que naissent la plupart des projets qui en valent la peine? »

- René Lévesque, 1976

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier le Dr Benjamin Kwok, qui a été le premier à m'offrir une chance dans son laboratoire. C'est grâce à lui si j'ai développé un intérêt précoce pour la recherche et les sciences et si j'ai par la suite pu continuer dans le laboratoire Labbé. J'aimerais également remercier mes superviseurs de stage du laboratoire Labbé, les Drs Nicolas Chartier et Laura Benkemoun. Ils ont fait preuve de grande patience et générosité pour me former durant mes deux premiers étés au laboratoire. Merci également de m'avoir fait assez confiance pour me laisser voler de mes propres ailes aussi rapidement.

Un énorme merci également à tous les membres – actuels ou passés – des laboratoires Labbé, Maddox et Gagnon. J'ai passé des moments mémorables avec vous, à rire, à parler de Ricardo, à repiquer des vers en écoutant l'*ultimate playlist*, à cuisiner et dans les moments les plus difficiles, à pleurer. Merci également à mes amis hors-IRIC, ainsi qu'à mes parents et mon frère. Vous m'avez vue grandir à travers les dernières années et m'avez écoutée et appuyée dans toutes les décisions que j'ai prises. Merci pour votre folie, votre immaturité et votre sens de l'humour. Merci également pour votre présence, votre support, votre amour et vos envolées philosophiques, politiques et scientifiques. Vous me faites du bien.

Je ne peux pas passer à côté de l'ÀÉIRIC, qui tient une place spéciale dans mon cœur. J'ai toujours été impliquée dans ma communauté, mais rarement me suis-je sentie autant à ma place que dans le cadre de mes fonctions de trésorière. J'ai eu le privilège de côtoyer des gens brillants et motivés, qu'ils soient étudiants, employés ou chercheurs principaux, et qui possédaient tous la même vision grandiose pour l'avenir de l'IRIC. Je vous remercie tous sincèrement pour votre ferveur et vos idées.

Je tiens à souligner le support technique de Christian Charbonneau de la plate-forme de microscopie pour toutes les fois où le Sweptfield a eu des caprices, ainsi que celui de Jean-Philippe Laverdure de la plate-forme de bio-informatique pour son aide dans la création de l'arbre phylogénétique. Je tiens également à remercier les organismes qui ont subventionné la poursuite de mon projet de recherche durant mes études, soit la fondation MACH-Gaenslenn du Canada et la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal.

Finalement, j'aimerais remercier particulièrement mon directeur de maîtrise, le Dr Jean-Claude Labbé. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir poussé à réaliser des choses que je n'aurais

pas cru être capable de faire. Merci de m'avoir transmis ton intérêt pour la science fondamentale. Merci pour ton esprit critique, pour ta confiance et pour ton honnêteté. J'ai tellement appris et grandi durant les cinq dernières années et tu en es une des causes principales. Merci pour tout.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1. L'ORGANISME MODÈLE *C. ELEGANS*

Le nématode *Caenorhabditis elegans* est un eucaryote d'environ 1 mm de longueur. L'hermaphrodite est constitué de 959 cellules somatiques et le lignage de chacune de ces cellules a été retracé depuis la fécondation de l'embryon [1]. À son extrémité antérieure se trouve la bouche, alors qu'à son extrémité postérieure se situent l'anus et la queue (Figure 1A). Deux tubes partagent la majorité de l'espace intérieur. Le premier est constitué de cellules endodermales et forme l'intestin. Le second est composé des cellules germinales et forme la gonade [2].

Le ver *C. elegans* hermaphrodite possède six chromosomes (Voir 2.1), chacun en deux copies : 1, 2, 3, 4, 5 et X. En cas de stress, certaines cellules germinales peuvent perdre un chromosome X et engendrer un organisme viable, qu'on appelle un mâle. L'hermaphrodite produit normalement environ 300 spermatozoïdes permettant l'auto-fertilisation de ses propres oocytes, mais il peut aussi être fertilisé par le mâle, qui ne possède que des spermatozoïdes. Cet aspect est utilisé lors d'analyses génétiques [2].

C. elegans passe à travers un cycle de vie contenant quatre stades larvaires, L1 à L4, et l'âge adulte (Figure 1C). Après le stade L1, si les ressources nutritives sont manquantes, le ver peut passer dans un stade transitoire nommé *dauer* (durée, en allemand), dans lequel il peut survivre durant plusieurs mois. Il ne se nourrit pas et sa gonade demeure au stade L2. Aux stades L3 et L4, la gonade s'étend. À l'âge adulte, le ver produit ses premiers ovocytes, qu'il fertilise lui-même [3]. Les mâles se développent de manière identique aux hermaphrodites jusqu'au stade L2. À ce moment, ils développent un organe sexuel à leur extrémité postérieure (Figure 1B). Leur gonade se développe aussi différemment, car elle contient une vésicule séminale et des canaux déférents [4].

C. elegans possède, entre autres, un lignage connu, un génome séquencé et des mâles, ce qui en fait un puissant outil génétique. De plus, le fait qu'il soit transparent permet la visualisation de protéines fluorescentes chez l'embryon autant que chez l'adulte. Il est couramment utilisé pour comprendre les processus cellulaires régissant le développement et la progression de maladies comme le cancer. Dans le cadre de mon projet de maîtrise, il est utilisé pour étudier les processus régissant la division cellulaire de ses embryons.

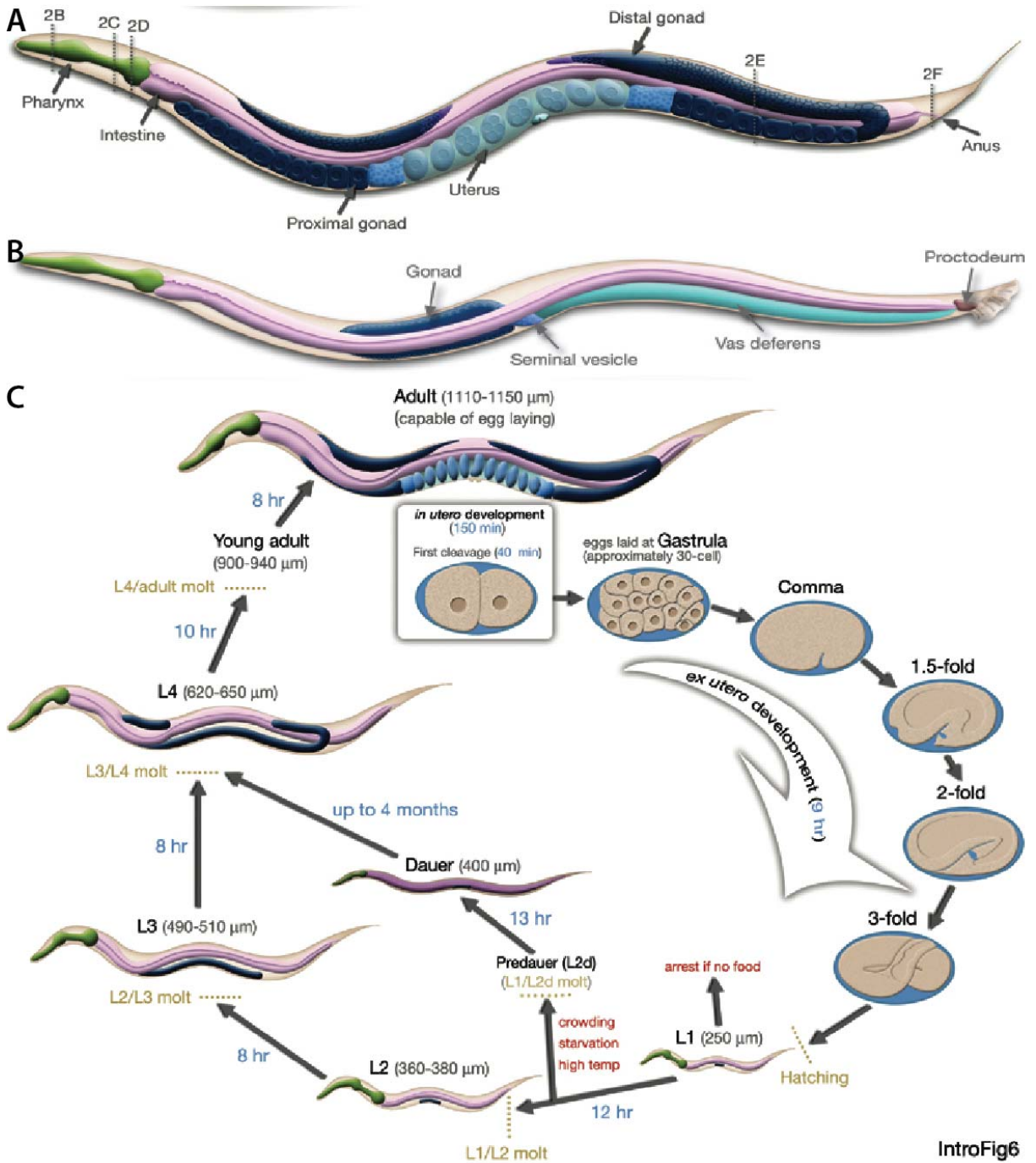


FIGURE 1.1. C. ELEGANS EST UN ORGANISME MODÈLE COURAMMENT UTILISÉ POUR DES ANALYSES GÉNÉTIQUES [3].

(A) Anatomie d'un vers hermaphrodite adulte. (B) Anatomie d'un vers mâle adulte. (C) Cycle de vie de *C. elegans*, de l'embryogénèse au vers adulte.

2. LE CYCLE CELLULAIRE

2.1. Description

Le cycle cellulaire représente l'ensemble des processus menant à la réplication de l'ADN d'une cellule mère, puis à sa division en deux cellules filles identiques. L'ADN est contenu dans des unités nommées chromosomes. Les organismes possèdent généralement deux copies de chaque chromosome, mais le nombre de chromosomes total peut varier d'un organisme à l'autre. On dit d'une cellule saine qu'elle est diploïde [2, 5].

Les chromosomes contiennent les gènes et des éléments régulateurs de l'expression des gènes, comme les ARNlnc et les ARNsi. Chaque cellule possède deux copies de chaque chromosome, une provenant du père et l'autre de la mère. Chaque individu possède donc deux copies de chaque gène. Pour un même gène, plusieurs variantes existent normalement dans une population. Ces variantes sont nommées allèles. Ainsi, un individu peut posséder deux versions différentes d'un même gène et ces allèles peuvent avoir des fonctions et des niveaux d'expression différents, voire inactiver complètement une fonction. Pour expliquer ces variations fonctionnelles, le moine et biologiste Gregor Mendel a suggéré la notion d'allèles dominants et récessifs. Un allèle dominant est celui dont la fonction est exprimée alors qu'une seule copie est présente. Un allèle récessif nécessite que deux copies soit présentes chez l'individu pour voir sa fonction exprimée. Il est parfois possible que deux allèles aient le même niveau d'expression. Dans ce cas, ils sont dits co-dominants [2, 5].

Lorsqu'un individu à génome diploïde possède deux allèles identiques d'un même gène, il est dit homozygote pour ce gène. Lorsqu'il possède deux allèles différents, il est dit hétérozygote, peu importe que ces allèles aient une relation de co-dominants ou de dominant-récessif. Pour qualifier cette composition génétique, on parle de génotype. Le phénotype est l'effet biologique qu'engendre un certain génotype [2, 5].

Le cycle cellulaire est composé des quatre phases principales suivantes (Figure 1.2) :

- 1) Phase G1 (croissance)
- 2) Phase S (synthèse)
- 3) Phase G2 (croissance)
- 4) Phase M (mitose/méiose)

Avant d'entrer dans le cycle cellulaire, la cellule se trouve en phase G0. Cette phase est caractérisée par la quiescence de la cellule, c'est-à-dire qu'elle ne se divise pas. La cellule absorbe juste assez de nutriments pour assurer sa survie et ses fonctions. Lorsque la cellule doit se diviser, elle entre dans le cycle cellulaire.

La phase G1 est la première phase de croissance de la cellule dans le cycle cellulaire. Durant cette période, la cellule absorbe un très grand nombre de nutriments afin d'augmenter son volume. Elle augmente également la production de protéines et d'ARNm, ce qui servira durant la phase S à répliquer l'ADN pour ainsi obtenir deux copies de chaque chromosome. La phase G2 est la seconde phase de croissance. La cellule s'y prépare pour la mitose en condensant ses chromosomes et en commençant la production des protéines et autres molécules importantes pour la division cellulaire. Les phases G1, S et G2 forment à elles trois l'interphase, c'est-à-dire la phase entre chaque division mitotique. Durant la phase M, la cellule mère se divise en deux cellules filles en y répartissant les chromosomes homologues répliqués précédemment.

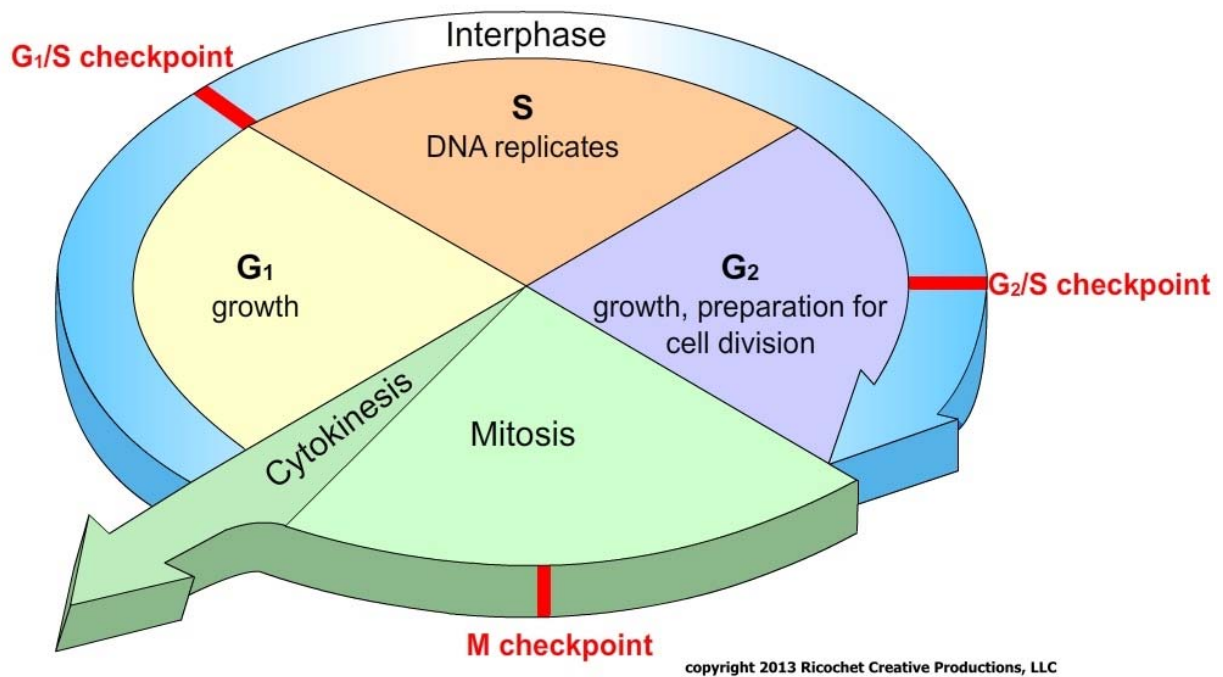


FIGURE 1.2. ÉTAPES DU CYCLE CELLULAIRE [6]

2.2. L'interphase

2.2.1. Machinerie de réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN nécessite en premier lieu le désenroulement des hélices d'ADN. Les topoisomérases permettent ce processus, en clivant un ou deux brins d'ADN, puis en les recollant. Vient ensuite l'assemblage d'un complexe de pré-réplication (pré-RC) sur les origines de réplication. Le complexe d'origines de réplication (ORC) adhère aux origines de réplication, où il recrute CDC-6 et CDT-1, respectivement un facteur de chargement d'hélicase et un facteur de marquage de la réplication. Ensemble, ORC, CDC-6 et CDT-1 chargent alors le complexe hexamérique MCM-2-7 sur l'ADN [7]. L'hélicase MCM-2-7 a une forme en anneau qui entoure l'ADN pour démarrer sa réplication [8, 9]. Cette étape se nomme « validation des origines ». Un grand nombre d'origines de réplication doit être validé avant l'entrée en phase S, pour assurer la réplication complète de l'ADN [10-12].

Après la validation des origines, le complexe d'initiation doit être activé afin de répliquer l'ADN. Durant la phase S, les S-Cdk, des complexes entre des cyclines S et leurs CDK correspondantes, promeuvent l'interaction du complexe MCM-2-7 avec Cdc45. Cela active la fonction hélicase de MCM-2-7 [13, 14]. La polymérase α peut alors accéder à l'ADN et démarrer la réplication de celui-ci dans le sens 5'→3'. La polymérase δ permet par la suite l'élongation des brins d'ADN dans le même sens. Pour conserver la polymérase sur l'ADN et ainsi assurer sa réplication jusqu'à la fin du processus, une pince protéique composée principalement de PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) est ajoutée au brin d'ADN simple [15].

2.2.2. Points de contrôle

Dans une cellule engagée dans le cycle cellulaire, des dommages à l'ADN peuvent entraîner la mort ou la dysfonction des cellules filles. Ces dommages peuvent être un bris du brin d'ADN ou des erreurs d'acides nucléiques s'étant glissées durant la réplication, par exemple. Également, si la cellule débute sa division alors que l'ADN n'est pas complètement répliqué, beaucoup d'informations nécessaires à la survie des cellules filles seront manquantes. Pour éviter ces défauts, les cellules ont mis au point des points de contrôle qui arrêtent la division cellulaire à certaines étapes, pour permettre de terminer ces étapes et de réparer les erreurs s'il y a lieu [16].

Pour continuer en phase M, les cellules nécessitent l'activité du complexe M-Cdk, composé de Cdk1 et de M-cycline. Ce complexe est activé par la phosphatase Cdc25. Certaines kinases, par exemple Wee1, contrecarrent l'effet de Cdc25 en phosphorylant M-Cdk, ce qui inactivent le complexe et empêche la progression en mitose.

2.3. La division cellulaire (Phase M)

2.3.1. Description

La division cellulaire est le processus par lequel une cellule se multiplie. La cellule mère se divise en deux cellules filles possédant la même machinerie métabolique et le même bagage génétique.

Deux processus de division cellulaire sont possibles (Figure 1.3). Le premier, la mitose, permet aux cellules somatiques de doubler leur nombre de chromosomes, pour ensuite les séparer en deux cellules distinctes. Le second, la méiose, permet aux cellules germinales de réduire à une seule copie le nombre de chaque chromosome. Ces cellules dites haploïdes sont des gamètes, soit des ovules ou des spermatozoïdes.

2.3.2. La mitose

La mitose est constituée des six phases suivantes (Figure 1.3A) :

- 1) Interphase : Les chromosomes sont sous forme de chromatine et ne sont pas distincts par analyses cytologiques. La machinerie de réplication de l'ADN (abordée au Chapitre 1-2.2) permet la duplication des chromosomes. Les deux copies sont attachées ensemble.
- 2) Prophase : La chromatine est compactée à l'aide de molécules d'échafaudage. Le fuseau mitotique commence à se former. Le fuseau mitotique est constitué de microtubules et possède deux pôles formés de structures nommées centrosomes.
- 3) Prométaphase : L'enveloppe nucléaire est dissoute et les chromosomes, désormais libres dans le cytoplasme, commencent à s'aligner avec le fuseau mitotique.
- 4) Métaphase : Les chromosomes complètent leur alignement au centre du fuseau mitotique, formant ainsi la plaque métaphasique.
- 5) Anaphase : Les chromosomes répliqués sont séparés et tirés chacun vers un pôle du fuseau mitotique.
- 6) Télaphase : Les membranes nucléaires réapparaissent autour des deux groupes de chromosomes correctement ségrégués. Le fuseau mitotique disparaît et l'ADN se décompacte. Il y a ensuite un processus nommé cytokinèse qui permet la séparation distincte des compartiments cellulaires en deux cellules indépendantes qui sont diploïdes. Les cellules filles retombent alors soit en interphase, soit en quiescence.

2.3.3. La méiose

La méiose est constituée des mêmes étapes que la mitose, mais le cycle a lieu deux fois plutôt qu'une (Figure 1.3B). Cela permet de réduire de moitié le nombre de chromosomes des

cellules germinales. Ainsi, à la fin de la phase S, chaque cellule possède quatre exemplaires de chaque chromosome (paternel et maternel). Puis, durant la prophase I et la prométaphase I, les chromosomes paternels et maternels sont alors alignés ensemble et un processus nommé recombinaison homologue a lieu. Ceci permet l'échange de matériel génétique entre les deux chromosomes et augmente la diversité génétique de la progéniture. Le reste de la méiose I est extrêmement similaire à la mitose. Après la première cytokinèse, chaque cellule fille possède un nombre diploïde de chromosomes recombinaison.

Pour réduire de moitié ce nombre, une seconde méiose a lieu. Cette fois, au lieu de ségréger les paires homologues, qui sont maintenant réparties dans chaque cellule, le processus sépare les chromatides sœurs, c'est-à-dire les deux copies parentales recombinaison. Après la seconde cytokinèse, il y a donc un total de quatre cellules filles haploïdes formées. Ces cellules nommées gamètes permettent la reproduction de l'organisme. En effet, un gamète mâle pourra fertiliser un gamète femelle et ces deux cellules fusionneront pour former un zygote, qui se développera en embryon, puis en organisme viable.

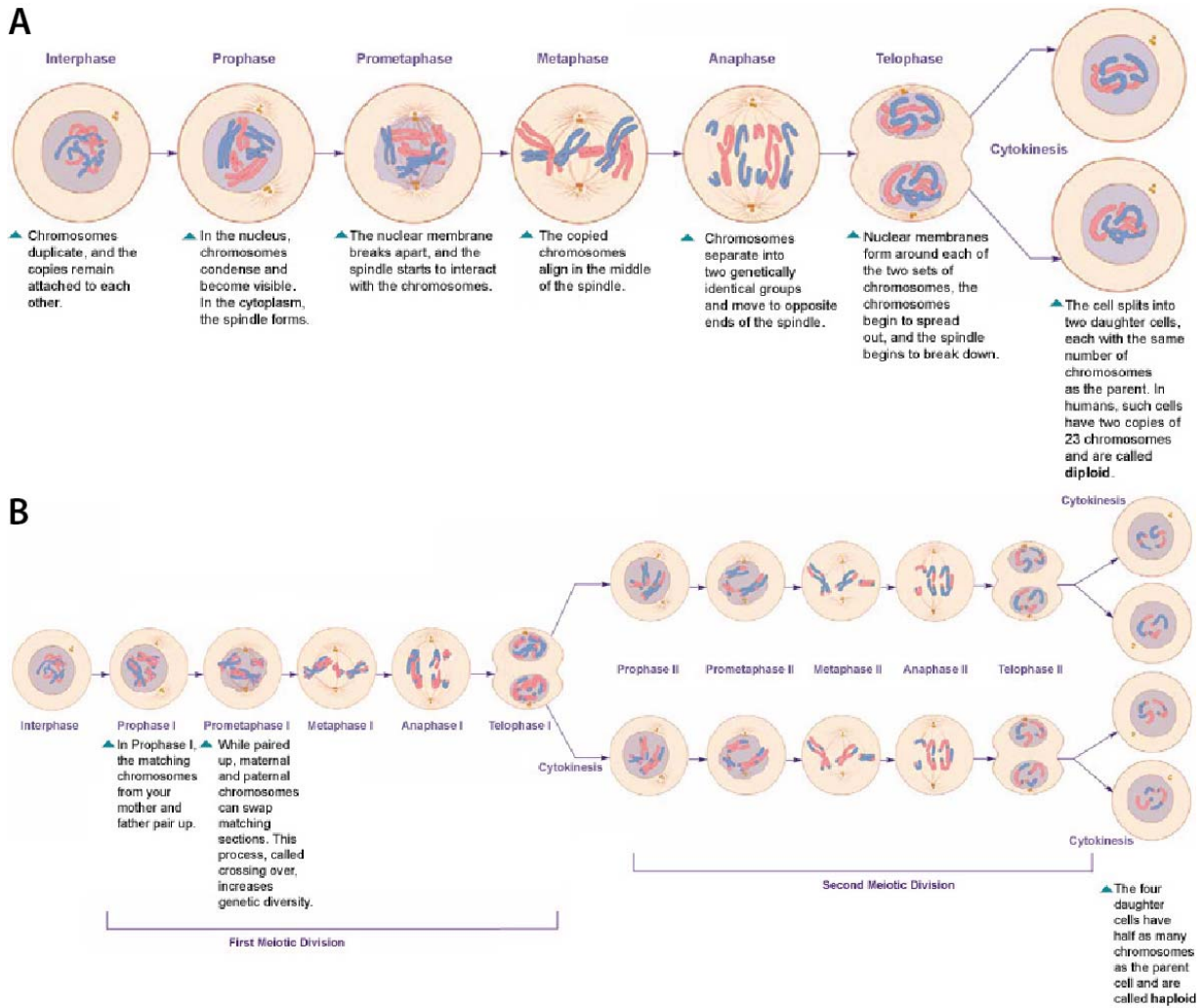


FIGURE 1.3. COMPARAISON DES ÉTAPES DES DEUX TYPES DE DIVISION CELLULAIRE [17].

(A) Mitose. (B) Méiose.

2.4. La division cellulaire asymétrique

Dans certains cas, la division cellulaire ne donne pas naissance à deux cellules filles identiques. Ce type de division cellulaire est dit asymétrique et nécessite que la cellule mère établisse et maintienne une polarité avant et pendant la division. De nombreux types cellulaires nécessitent une division cellulaire asymétrique. Par exemple, chez la drosophile, la formation des neurones et de leur polarité axone-dendrite nécessite une division cellulaire asymétrique dès la première division cellulaire. Le neuroblaste engendre un neurone et un précurseur neuronal intermédiaire, qui subit une seconde division asymétrique pour produire deux neurones. [18, 19].

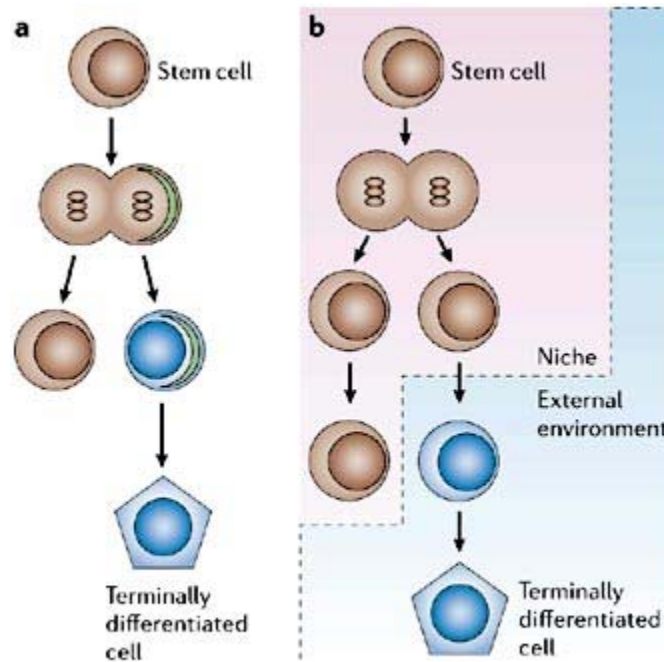
Les cellules souches sont elles aussi un excellent exemple de division cellulaire asymétrique (Figure 1.4). Les cellules souches sont des cellules progénitrices qui sont multipotentes. Elles sont parfois situées dans un espace nommé « niche ». Elles s'y auto-renouvellent ou se différencient, selon les besoins de l'organisme. Pour s'auto-renouveler, les cellules se divisent en orientant leur fuseau mitotique parallèlement à un plan, par exemple la niche. Les protéines dirigeant la polarité sont alors réparties symétriquement dans la cellule, ce qui mène à la formation de deux nouvelles cellules souches. Pour se différencier, les cellules doivent orienter leur fuseau mitotique perpendiculairement à ce même plan. Les deux pôles de la cellule ne possèdent alors pas les mêmes déterminants cellulaires, ce qui mène à une division cellulaire asymétrique et à la formation à la fois d'une cellule précurseure et d'une cellule souche [20].

Pour qu'une division cellulaire asymétrique soit viable, la polarité cellulaire pré-mitotique, le positionnement du fuseau mitotique et la localisation du site de clivage doivent être très bien régulés [21, 22].

La division cellulaire asymétrique est régie par deux mécanismes, qui peuvent agir conjointement :

- 1) La cellule mère peut émettre des facteurs pour établir son axe de polarité de manière autonome (voir 3.2. Localisation des centrosomes) (Figure 1.4A);
- 2) La polarité peut être établie par des facteurs émis par les cellules environnantes [23] (Figure 1.4B).

Il arrive que des défauts intègrent la division cellulaire asymétrique. Ceux-ci peuvent être par exemple la suppression de gènes suppresseurs tumoraux ou des défauts dans la localisation des déterminants cellulaires. Cela entraîne la formation de cellules multipotentes immortelles qui ne parviennent pas à se différencier, mais sont insensibles aux signaux antiprolifératifs. Ces cellules souches sont alors dites cancéreuses, car leur accumulation peut entraîner la formation de tumeurs [20, 23].



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

FIGURE 1.4. DIVISION CELLULAIRE ASYMÉTRIQUE DES CELLULES SOUCHES [24]

(A) Les cellules souches se divisent asymétriquement grâce à la localisation des déterminants cellulaires dans un pôle de la cellule en division. (B) Les cellules souches peuvent se diviser asymétriquement en réaction à un changement d'environnement.

3. LA DIVISION CELLULAIRE ASYMÉTRIQUE CHEZ *C. ELEGANS*

Chez *C. elegans*, la différenciation de l'embryon est obtenue par division asymétrique. Chaque division cellulaire permet la progression dans le lignage et éventuellement l'établissement d'un destin cellulaire, que ce soit la différenciation en un type cellulaire ou l'apoptose [1]. Pour permettre ces divisions asymétriques, l'embryon précoce présente donc une polarisation dans l'axe antéropostérieur, ce qui en fait un modèle idéal pour étudier la polarité cellulaire.

La polarité embryonnaire de *C. elegans* est constituée de deux phases principales (Figure 1.5) [25]:

- 1) **Phase d'établissement** : La polarité embryonnaire est établie suite à la fertilisation de l'ovule par le spermatozoïde, dans ce qui deviendra le pôle postérieur de l'embryon [26, 27]. C'est effectivement le point d'entrée du spermatozoïde qui détermine l'axe antéropostérieur [27-29]. Le complexe PAR-3/PAR-6/PKC-3 (abordé au point 3.1) est exclus du cortex de cette région, alors que PAR-2 s'y accumule. PAR-1 et MEX-5/6

permettent la croissance du domaine postérieur. Le pro-noyau femelle est alors transporté vers le pôle postérieur via le mouvement de l'actomyosine. Cela mène à la rencontre des deux pro-noyaux dans le pôle postérieur de l'embryon [25, 30].

- 2) **Phase de maintenance** : La polarité embryonnaire est maintenue principalement grâce aux protéines PAR (*partitioning*). Par exemple, PAR-2, localisée dans le pôle postérieur, en exclut le complexe PAR-3/PAR-6/PKC-3. Durant ce temps, les deux pro-noyaux migrent ensemble vers le centre de l'embryon.

Une fois la polarité établie et maintenue, l'enveloppe nucléaire des deux pro-noyaux est dissoute et la première division cellulaire embryonnaire a lieu. Cette division cellulaire est asymétrique : la cellule fertilisée nommée P0 se divise en une cellule antérieure plus large nommée AB et en une cellule postérieure plus petite nommée P1. AB et P1 sont asynchrones, AB se divisant avant P1. Les divisions cellulaires subséquentes à AB mènent à la formation de l'ectoderme, alors que celles de P1 mènent à la formation de l'endoderme, du mésoderme et de la lignée germinale [1].

Plusieurs processus sont observés dans l'établissement de la polarité dans l'embryon précoce : la contraction de l'actomyosine corticale (3.1), la localisation des centrosomes (3.2), la ségrégation asymétrique des déterminants cellulaires (3.4) et l'asynchronie des processus de réplication de l'ADN des cellules AB et P1 (3.4). Tous ces processus sont interdépendants et sont décrits ici-bas.

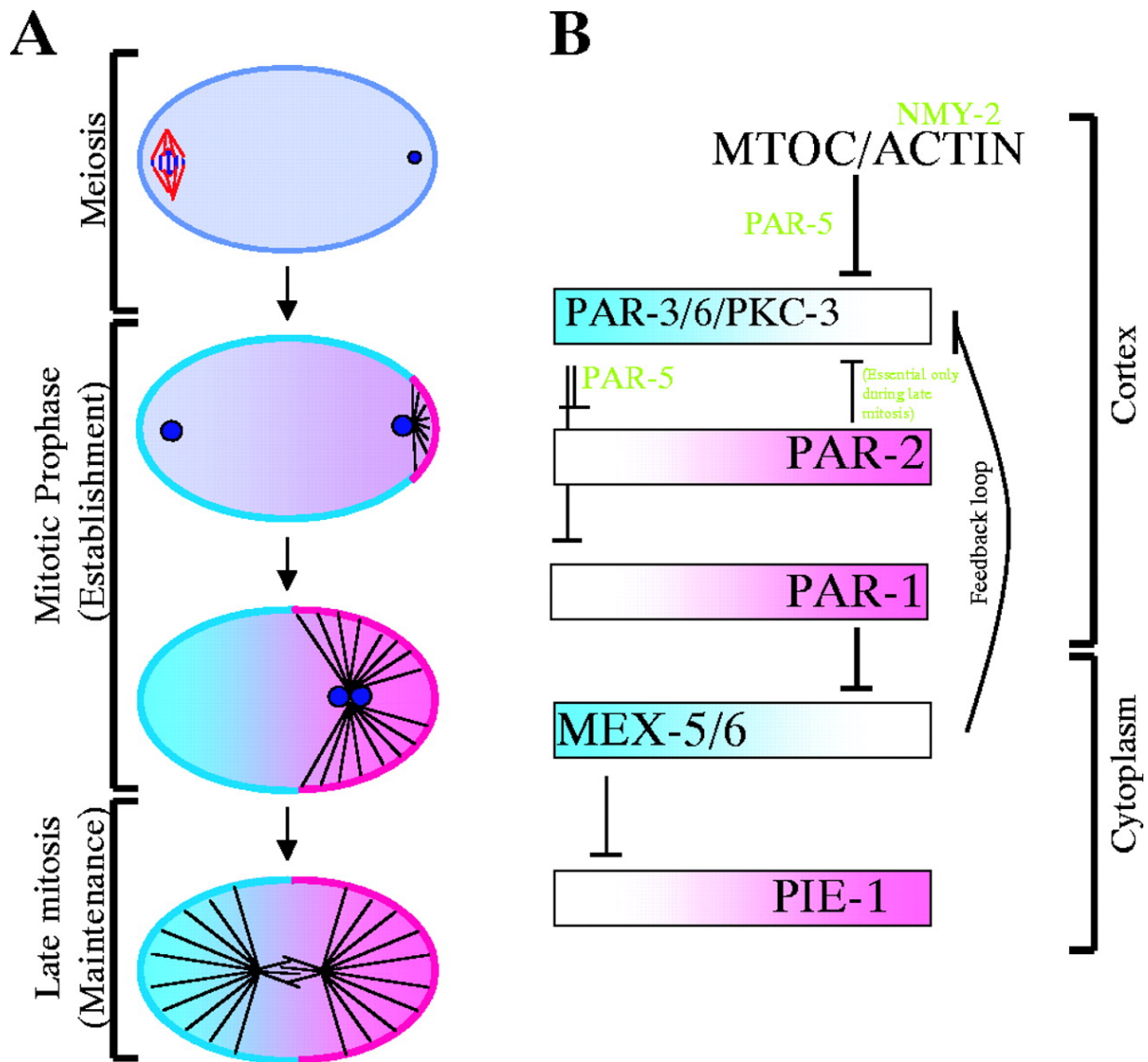


FIGURE 1.5. PHASES DE LA POLARITÉ EMBRYONNAIRE [25]

(A) Phases d'établissement et de maintenance de la polarité. (B) Localisation de PAR-1, PAR-2, PAR-3/PAR-6/PKC-3 et MEX-5/6 durant la polarisation de l'embryon.

3.1. Contraction du cortex

Le cytosquelette est composé de microfilaments de dimères d'actine qui subissent des modifications selon les besoins de la cellule. Elles interagissent avec les myosines, qui sont des protéines motrices. Les myosines se lient à l'actine via leur tête, qui hydrolyse l'ATP. Par exemple, dans les cellules musculaires, les filaments d'actine interagissent avec la myosine et la titine pour

former des structures contractiles nommées myofibrilles. Ces chaînes de myofibrilles permettent la contraction des muscles [31].

Suite à la fertilisation de l'embryon de *C. elegans*, les filaments d'actine interagissent avec la myosine non-musculaire (NMY-2), ce qui leur permet de glisser les uns sur les autres. Cette structure est appelée filament d'actomyosine. Le glissement de la myosine sur l'actine permet la contraction du cortex embryonnaire [30, 32, 33]. Ces contractions cessent lorsqu'elles atteignent le pro-noyau mâle dans le pôle postérieur, où le réseau d'actomyosine est instable. Pour compenser pour cette relaxation, l'actomyosine corticale se déplace vers le pôle antérieur, entraînant avec elle des éléments du cortex cellulaire nécessaires à l'établissement de l'asymétrie, tel que le complexe cortical PAR-3/PAR-6/PKC-3 [32]. Les mouvements contractiles forment deux pôles chez l'embryon précoce : un pôle antérieur contractile et un pôle postérieur non contractile [30].

Plusieurs mécanismes agissent sur la contraction du cytosquelette (Figure 1.6). Il a été proposé que la RhoGAP (protéine activatrice de GTPase Rho) CYK-4 permette d'abord de déstabiliser le réseau d'actomyosine dans le pôle postérieur. Cela permet au complexe PAR-3/PAR-6/PKC-3 de promouvoir le déplacement de l'actomyosine en collaborant avec les petites GTPases RHO-1 et CDC-42, ainsi que le RhoGEF (facteur d'échange de nucléotides guanyliques pour Rho) ECT-2 au cortex du pôle antérieur et les RhoGAP RGA-3/4 dans le pôle antérieur [32, 34-39]. ECT-2 active RHO-1 en favorisant la substitution de son GDP hydrolysé par un GTP. RHO-1 active ensuite la contractilité du réseau d'actomyosine de manière uniforme dans l'embryon en agissant via ROCK (*Rho-associated protein kinase*), qui phosphoryle la myosine pour favoriser la liaison de l'actine à la myosine [40]. CDC-42 permet de relier le complexe PAR-3/PAR-6/PKC-3 au réseau d'actomyosine [37, 41-44]. Lorsque les centrosomes du pro-noyau mâle, situés dans le pôle postérieur, s'assemblent, ils envoient un signal d'activation aux RGA-3/4 paternels, qui empêchent alors la présence de ECT-2 tout en inhibant l'activité de RHO-1 dans cette région [45]. L'actomyosine cesse donc de s'y contracter, permettant ainsi l'établissement de la polarité [32, 45]. CDC-42, liée à l'actomyosine, migre vers le pôle antérieur en entraînant avec elle le complexe PAR-3/PAR-6/PKC-3 [46]. Une fois le déplacement entamé, RHO-1, ECT-2, CDC-42 et le complexe PAR-3/PAR-6/PKC-3 permettent d'activer de manière rétroactive la migration de l'actomyosine vers le pôle antérieur [37, 45, 47-49]. Le mouvement cortical permet le déplacement de déterminants cellulaires dans chacun des deux pôles de l'embryon (abordé en 3.2) [50].

Il a également été proposé que PAR-2, localisée dans le pôle postérieur, y empêche l'accumulation de NMY-2, ce qui favorise la migration de l'actomyosine corticale vers le pôle antérieur [32, 36, 49].

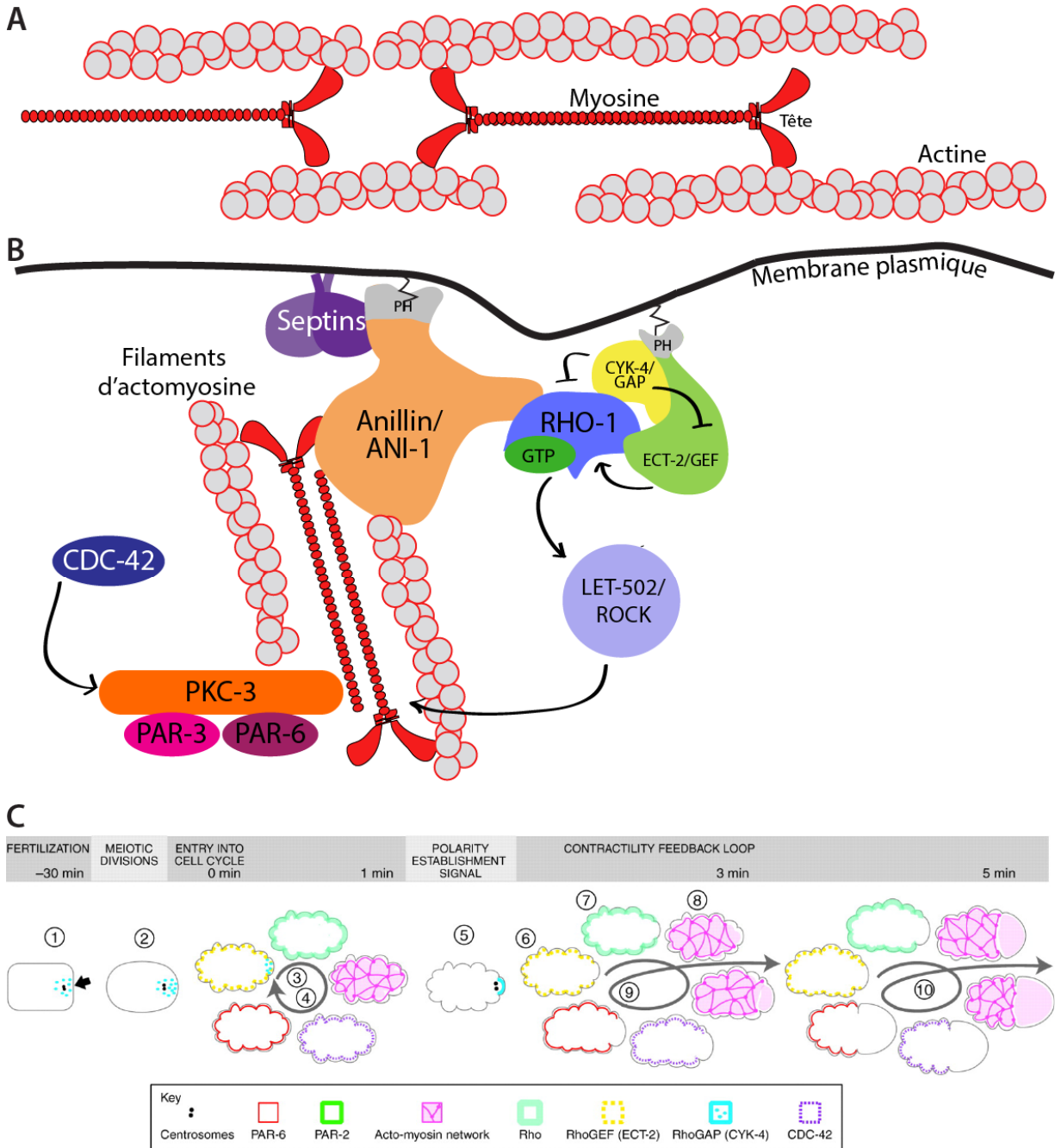


FIGURE 1.6. CONTRACTILITÉ DU CORTEX DE *C. ELEGANS* [47]

(A) Interaction des filaments d'actine avec la tête des myosines. La myosine est représentée en rouge et l'actine en gris. (B) Modèle de l'interaction des protéines impliquées dans la contraction du cortex. (C) Étapes de contraction du cortex de l'embryon de *C. elegans*. 1. Fertilisation de l'oocyte par le spermatozoïde. 2. L'embryon entame sa division méiotique. 3. ECT-2 active RHO-1, qui active ensuite la contractilité du réseau d'actomyosine de manière uniforme dans l'embryon. 4. CDC-42 recrute le complexe PAR-3/PAR-6/PKC-3 au cortex. 5-8. CYK-4 est activé par les

centrosomes, ce qui entraîne la délocalisation d'ECT-2 au cortex dans le pôle postérieur. RHO-1 devient alors inactive dans cette région, ce qui arrête la contraction de l'actomyosine. 9. CDC-42 devient également localisé dans le pôle antérieur, entraînant avec elle le complexe PAR-3/PAR-6/PKC-3. 10. Une boucle de rétroaction est créée, entraînant la contractilité du réseau d'actomyosine dans le pôle antérieur.

3.2. Localisation des centrosomes

Tel que mentionné plus tôt, ce sont les centrosomes paternels qui, lorsqu'assemblés, initient la polarité via la migration de l'actomyosine vers le pôle antérieur en envoyant un signal d'activation à RGA-3/4 [45]. Bien qu'ils soient nécessaires à l'initiation de la polarité, les centrosomes ne semblent pas l'être pour le maintien de la polarité [29].

Suite à la fertilisation de l'oocyte par le spermatozoïde, les centrosomes paternels nucléent des microtubules péricentriolaires, ce qui leur permet de se rapprocher du cortex. Leur position dans l'embryon détermine ce qui deviendra le pôle postérieur [27, 29]. La protéine postérieure PAR-2 se lie aux microtubules centrosomaux, ce qui empêche sa phosphorylation par la protéine antérieure PKC-3 et lui permet donc de se lier au cortex postérieur [51, 52].

Les mécanismes régissant le rôle exact des centrosomes dans l'établissement de la polarité ne sont pas encore très clairs. La nucléation des microtubules semble jouer un rôle via PAR-2 pour générer une boucle de rétroaction positive pour la migration de l'actomyosine corticale [28, 29, 51, 52]. Ce mécanisme semble conservé chez la drosophile, car il a été montré que la protéine postérieure PAR-1 peut définir le pôle postérieur de l'oocyte en modifiant le réseau de microtubules [53]. Il a également été proposé que des protéines de l'aster puissent inactiver RHO-1 pour générer l'asymétrie corticale, mais les mécanismes demeurent incompris [52].

3.3. Ségrégation des déterminants cellulaires

L'établissement de la polarité est dicté par l'actomyosine corticale. Par la suite, l'embryon qui doit se différencier doit préparer sa division cellulaire asymétrique. Pour ce faire, il emploie des molécules nommées « déterminants cellulaires » qui ségrégent dans un pôle de la cellule en division, pour y marquer le destin cellulaire.

Par exemple, la protéine à doigts de zinc CCCH PIE-1, fournie par la mère, est initialement symétrique [54, 55]. PIE-1 est localisée dans le pôle postérieur de P0 juste avant la première division asymétrique [56]. Suite à la division cellulaire, le doigt de zinc CCCH de PIE-1 permet sa

dégradation dans la cellule somatique [57]. Durant les quatre premières divisions cellulaires, PIE-1 ségrégera dans les blastomères de la lignée germinale pour permettre leur développement [54, 55].

PIE-1 agit dans le noyau des cellules germinales en y réprimant la transcription des ARNm embryonnaires [55, 56, 58, 59]. Pour ce faire, il a été proposé que PIE-1 inhibe CDK-9, qui phosphoryle et active normalement le phosphoépitope H5 du domaine C-terminal de RNAPII (ARN polymérase II)[59-61]. Entre autres, une des fonctions de PIE-1 serait de réguler l'activité de SKN-1 dans la cellule P2. En effet, SKN-1 est un facteur de transcription qui permet l'activation du destin des cellules somatiques E et MS et qui est exprimé dans les cellules EMS et P2. PIE-1 régulerait donc l'expression des gènes activés par SKN-1 [62].

La localisation de PIE-1 dans le pôle antérieur est inhibée par les protéines cytoplasmiques et antérieures MEX-5 et MEX-6. MEX-5 et MEX-6 sont régies par la protéine corticale postérieure PAR-1 [63, 64].

3.4. Asynchronie des cycles cellulaires

Suite à la contractilité asymétrique de l'actomyosine corticale, au positionnement des centrosomes et à la ségrégation asymétrique des déterminants cellulaires, l'embryon P0 procède à une division cellulaire pour obtenir un blastomère AB antérieur et un blastomère P1 postérieur. On peut alors observer une conséquence de la division cellulaire asymétrique, c'est-à-dire l'asynchronie de la division cellulaire entre AB et P1. En effet, suite à la première division embryonnaire, la cellule AB est considérablement plus grosse que P1 et se divise environ 100 secondes avant elle [1].

3.4.1. Modifications au cycle cellulaire dans P1

Il a été proposé que la cellule P1 puisse hériter d'un plus petit nombre de facteurs de transcription suite à la ségrégation des déterminants cellulaires dans la cellule P0 [65, 66]. Ce modèle est basé sur une expérience de Schierenberg et Wood, qui consistait à fusionner le cytoplasme des cellules AB et P1. Il en résultait une division cellulaire synchrone pour les deux noyaux [66]. Brauchle et al. ont par la suite démontré qu'en absence de la sous-unité α de la protéine G hétérotrimérique GPB-1/GOA-1/GPC-2, nécessaire pour déterminer la taille des cellules AB et P1, les cellules AB et P1 se divisaient avec un délai plus court (70s) que normalement [65, 67]. Le modèle suggéré par Brauchle et al. implique que la quantité limitée de facteurs de transcription dans P1 soit à l'origine d'un défaut dans la machinerie de répllication de l'ADN durant

la phase S de P1, créant ainsi un stress dans celle-ci et suractivant le point de contrôle des dommages à l'ADN. Cela serait à l'origine de l'asynchronie observée dans les premières divisions embryonnaires de *C. elegans* [65, 68].

Dans une cellule sur le point de se diviser, le point de contrôle des dommages à l'ADN permet de vérifier la qualité de l'ADN répliqué. Si trop d'erreurs s'y sont glissées, le cycle cellulaire est arrêté à cette étape. Chez *C. elegans*, les kinases ATL-1 et ATM-1, de la famille des kinases pseudo-PI3K (kinase phosphatidylinositol-3), constituent la première ligne de défense pour détecter les dommages dans l'ADN double brin après la réplication [69]. ATM-1 permet de déclencher le recrutement des acteurs du point de contrôle via la phosphorylation de plusieurs substrats, alors qu'ATL-1 est particulièrement efficace pour détecter les erreurs insérées dans la fourche de réplication [70, 71]. Elle agit à la fois pour arrêter la réplication de l'ADN et pour réparer les erreurs [72]. Ensemble, les PI3K phosphorylent plusieurs substrats, y compris l'E3 ubiquitine ligase MDM2 qui inactive le suppresseur tumoral CEP-1/p53, ainsi que la pince protéique PCNA et les kinases de point de contrôle CHK-1 et CHK-2 [73]. CHK-1 et CHK-2 inactivent toutes deux Cdc25, qui permet la progression dans le cycle cellulaire [71, 74, 75]. Particulièrement dans l'embryon précoce de *C. elegans*, Brauchle et al. ont suggéré que P1 suractive des protéines de son point de contrôle de la réplication, par exemple ATL-1 et CHK-1, ce qui mène à la fois à la réparation des défauts dans l'ADN et à la division asynchrone entre les cellules filles AB et P1 [65].

3.4.2. Modifications au cycle cellulaire dans AB

L'asynchronie entre AB et P1 est également due à une accélération de l'entrée en mitose dans le blastomère AB. La protéine antérieure PLK-1 (*polo-like* kinase) serait responsable de cette caractéristique. PLK-1 est l'orthologue de la kinase humaine Plk1 et active entre autres Cdc25 par phosphorylation, ce qui permet ainsi l'entrée en phase M du cycle cellulaire. PLK-1 agit également sur plusieurs autres processus reliés à la division cellulaire, tels que la biogénèse des centrosomes et la formation de l'anneau contractile durant la cytokinèse [76]. Un modèle a été proposé selon lequel la présence plus grande de PLK-1 dans le blastomère AB permettrait à PLK-1 d'activer plus rapidement l'entrée en mitose de ce dernier que dans P1, via les protéines antérieures MEX-5 et MEX-6 mentionnées précédemment [77, 78].

3.5. Les protéines PAR et la division cellulaire asymétrique

Les six protéines PAR (*partitioning*), qui sont très bien conservées d'un organisme à l'autre, constituent des éléments essentiels pour l'établissement de la polarité dans l'embryon précoce de *C. elegans*. Elles interagissent pour réguler les éléments de l'établissement et du maintien de l'asymétrie mentionnés précédemment.

3.5.1. Distribution

La distribution correcte des protéines PAR est essentielle pour permettre l'établissement de la polarité dans l'embryon précoce de *C. elegans* [79, 80]. En effet, les mutants *par* montrent une perte de la polarité embryonnaire et ne survivent pas [81].

Toutes les protéines PAR sont initialement localisées symétriquement au cortex de l'embryon précoce. Les protéines PAR-4 et PAR-5 demeurent distribuées symétriquement dans l'embryon, à la fois au cortex et dans le cytoplasme [80, 82]. Durant la contraction du pôle antérieur, les protéines PAR-3 et PAR-6 deviennent localisées à la périphérie du pôle antérieur, alors que PAR-2 et PAR-1 deviennent localisées à la périphérie du pôle postérieur [32, 35, 83-85].

Tel que mentionné plus haut, les protéines PAR interagissent pour établir la polarité. Entre autres, elles forment entre elles plusieurs boucles de rétroaction pour permettre leur distribution adéquate dans l'embryon précoce. Ces interactions sont répertoriées ici :

- La localisation de PAR-1 et PAR-2 dans le pôle postérieur, ainsi que celle de PAR-3 et PAR-6 et PKC-3 dans le pôle antérieur, nécessitent l'activité de PAR-5. PKC-3 n'est pas une protéine PAR, mais elle agit avec PAR-3 et PAR-6 pour former le complexe PAR-3/PAR-6/PKC-3 qui joue un rôle important dans la contractilité du réseau d'actomyosine cortical [35, 80];
- La localisation de PAR-2 est dépendante de l'activité de PAR-3 [44, 83], mais le contraire est également vrai, car PAR-3 nécessite l'activité de PAR-2 pour être localisé convenablement [84];
- PAR-3 et PAR-4 permettent la localisation de PAR-1 au pôle postérieur, ainsi que son activation [84, 86, 87];
- PAR-2 permet la localisation de PAR-1 au cortex de l'embryon [83];
- La localisation de PAR-6 dans le pôle antérieur nécessite l'activité de PAR-3 et de PKC-3 [35]. Inversement, la localisation de PAR-3 au cortex nécessite l'activité de PAR-6 [50];

- La localisation de PAR-3 et PAR-6 dans le pôle antérieur nécessite l'activité de PAR-2 et PAR-4 [35].
- La localisation de PAR-1 et PAR-2 au cortex postérieur nécessite la phosphorylation par PKC-3 pour les exclure du pôle antérieur [52].
- De même, la localisation de PAR-3 et PAR-6 et PKC-3 nécessite leur exclusion du pôle postérieur par PAR-1 et LGL-1 via la phosphorylation [52, 88]. LGL-1 n'est pas non plus une protéine PAR.

3.5.2. Fonctions

Les protéines PAR sont impliquées directement ou indirectement dans tous les processus menant à l'établissement de la polarité dans l'embryon précoce de *C. elegans* [79, 81]. Elles sont extrêmement bien conservées d'un organisme à l'autre [35, 85].

PAR-1 est une kinase à sérine/thréonine impliquée dans la ségrégation des déterminants cellulaires et la régulation du cycle cellulaire [85, 89]. PAR-2 contient des motifs de liaison à l'ATP (adénosine triphosphate) et un domaine RING de type C3HC4 [90]. Ce type de doigt de zinc est répandu chez les E3 ubiquitine ligases [91-93]. PAR-3 et PAR-6 sont des protéines à domaine PDZ [35, 84]. PAR-4 est une kinase à sérine/thréonine impliquée dans la régulation de l'établissement de la polarité antéropostérieure [82]. Finalement, PAR-5 est une protéine 14-3-3 [80]. Ce type de protéine permet de réguler la signalisation cellulaire [94].

Tel que mentionné plus haut (3.1. Contraction du cortex), PAR-3 et PAR-6 interagissent avec PKC-3 durant la polarisation de l'embryon pour former le complexe PAR-3/PAR-6/PKC-3, qui permet la contraction du cytosquelette d'actomyosine et sa migration vers le pôle antérieur [32, 35]. PAR-2 favorise également la migration d'actomyosine corticale vers le pôle antérieur en inhibant la présence de NMY-2 dans le pôle postérieur [32, 36]. La contraction du cytosquelette permet par la suite la localisation des déterminants cellulaires dans le pôle postérieur [50, 83].

PAR-3, PAR-5 et PAR-6 sont nécessaires pour dicter la localisation du fuseau mitotique et ainsi déterminer la grosseur des deux blastomères filles AB et P1 [50, 80, 84].

Par la suite, lors des divisions cellulaires d'AB et P1, PAR-2, PAR-3, PAR-5 et PAR-6 sont nécessaires pour permettre l'orientation adéquate des fuseaux mitotiques de ces cellules et pour ainsi dicter les motifs de clivage de la deuxième division cellulaire [36, 50, 80]. PAR-1, PAR-4 et PAR-5 sont nécessaires pour permettre l'asynchronie des divisions cellulaires d'AB et P1 [80].

Les fonctions de PAR-1 et PAR-4 sont décrites plus précisément ci-dessous.

3.5.3. PAR-1/MARK

PAR-1 est une kinase à sérine/thréonine extrêmement bien conservée. Son homologue chez l'humain est MARK et celui chez la levure est KIN1 [85, 95]. Chez la drosophile, l'orthologue de PAR-1 permet de définir le pôle postérieur de l'embryon pour y localiser l'ARNm oskar, qui est nécessaire pour la polarité et le développement de l'embryon [53].

Les kinases à sérine/thréonine sont très répandues [96]. Elles phosphorylent le groupement -OH de résidus sérine ou thréonine. Via son activité kinase, PAR-1, héritée de la mère, restreint la présence du déterminant cellulaire PIE-1 au pôle postérieur [58, 63, 64, 79, 81, 85]. En effet, PAR-1 restreint la localisation de MEX-3, MEX-5 et MEX-6 au pôle antérieur, probablement en phosphorylant une sérine de leur domaine C-terminal [64, 97]. En retour, MEX-5 et MEX-6 permettent la localisation de PIE-1 dans le pôle postérieur [63]. PAR-1 joue donc un rôle dans l'établissement de la polarité embryonnaire, en plus de permettre le développement de la lignée germinale [85, 98], mais ces fonctions ne nécessitent pas la localisation asymétrique de PAR-1 [99].

3.5.4. PAR-4/LKB1

PAR-4 est une kinase à sérine/thréonine également très bien conservée [82]. Le suppresseur tumoral LKB1 est l'orthologue de PAR-4 chez l'humain [82, 100].

Chez *C. elegans*, PAR-4 est héritée de la mère [81]. PAR-4 est située dans les embryons, dans la gonade et dans les oocytes non fertilisés [82]. Elle régule la mobilité corticale de la myosine durant la polarisation de l'embryon via les protéines d'échafaudage ANI-1 et ANI-2, favorisant ainsi la contractilité cellulaire et la ségrégation asymétrique des autres protéines PAR [82, 101] (Figure 1.7). PAR-4 promeut également l'activation et l'accumulation de PAR-1 au pôle antérieur de l'embryon précoce [86, 87]. Via PAR-1, PAR-4 promeut donc la ségrégation des déterminants cellulaires et régule le cycle cellulaire [64, 89]. En effet, les activités de PAR-4 et PAR-1 sont toutes deux nécessaires pour permettre la phosphorylation d'une sérine du domaine C-terminal de MEX-5, qui permet par la suite la localisation de PIE-1 [64, 102]. La perte de l'activité de *par-4* empêche l'établissement de trois phénotypes de l'établissement de la polarité, soit :

- la ségrégation asymétrique des déterminants cellulaires [89],
- la régulation asynchrone du cycle cellulaire [223] et
- la contractilité des filaments d'actomyosine [32, 224].

La perte de *par-4* est donc létale pour l'embryon [81, 87].

Chez la drosophile, Par-1 est phosphorylée par Lkb1 *in vitro* [103]. Il a été montré que Lkb1 régule l'établissement de la polarité antéropostérieure dans l'oocyte précoce de la drosophile, en repolarisant le cytosquelette de l'oocyte [104]. Chez l'humain, LKB1 est une kinase à sérine/thréonine se trouvant en amont de 11 kinases reliées à la voie de signalisation de l'AMPK, dont MARK1-4, les orthologues de PAR-1 [86, 105]. L'interaction entre PAR-4 et PAR-1, bien que légèrement différente, semble donc être conservée d'un organisme à l'autre pour réguler la polarité de certains types cellulaires, démontrant un rôle global pour PAR-4/LKB1 dans la polarisation [104].

Plusieurs allèles de *par-4* ont été répertoriés. La plupart des allèles à mutation faux-sens se retrouvent dans le domaine kinase de *par-4*[82]. Deux de ces allèles, *it47* et *it57*, sont thermosensibles [89]. À 15°C, les vers expriment un phénotype WT complet, alors qu'à 25°C, ils expriment un phénotype mutant *par-4* complet, c'est-à-dire qu'une létalité embryonnaire de 100% est observable, ainsi que des défauts dans la contractilité de l'actomyosine, dans la localisation des déterminants cellulaires et dans l'asynchronie entre AB et P1.

3.5.4.1. PAR-4 et l'énergie cellulaire

Finalement, PAR-4 régule la prolifération des GSC (cellules souches germinales) via l'AMPK (AMP kinase), mais cette voie est inactive dans l'embryon. L'AMPK est une protéine hétérotrimérique impliquée dans de nombreux processus métaboliques pour gérer les niveaux d'énergie [106]. Elle est composée des trois sous-unités α , β et γ . Chez l'humain, il existe deux isoformes de la sous-unité α , deux isoformes de la sous-unité β et trois isoformes de la sous-unité γ . L'AMPK agit sur plusieurs voies métaboliques, notamment sur le complexe mTORC1, qu'elle inhibe pour empêcher la synthèse de protéines lorsque les niveaux énergétiques sont trop faibles dans la cellule [106]. L'ATP, nécessaire pour fournir de l'énergie aux cellules, est produite par les cellules via la réaction $2ADP \rightarrow ATP + AMP$. En temps normal, le ratio d'ATP/ADP est d'environ 10/1, donc la réaction tend vers l'hydrolyse d'ATP en ADP. Lorsque les cellules subissent un stress, par exemple une baisse de glucose, l'AMP s'accumule et se lie à l'AMPK pour l'activer, ce qui permet, entre autres, d'augmenter les niveaux d'ATP produits [107].

Chez l'humain, LKB1 est exprimé principalement dans le noyau des cellules. Elle agit dans un complexe hétérotrimérique avec STRAD et MO25 et lorsque ce complexe est formé, il est relocalisé au cytoplasme pour permettre la phosphorylation de l'AMPK et ainsi réguler la mitose

de certains types cellulaires [87, 105, 108-113]. STRAD est une pseudokinase, c'est-à-dire qu'elle possède une homologie aux kinases de la famille STE20, mais avec un domaine catalytique inactif [111]. C'est ce domaine pseudokinase qui se lie à LKB1 [112]. Il existe deux isoformes de STRAD chez l'humain, mais ils semblent agir de la même façon pour activer LKB1 [110]. MO25 se lie à STRAD et stabilise son interaction avec LKB1 [110, 112]. Ces interactions semblent être conservées chez *C. elegans*, puisque la liaison de PAR-4 et STRD-1, l'orthologue de STRAD, permet la phosphorylation de l'AMPK et son activation. L'AMPK peut alors induire la quiescence des GSCs [102, 114, 115].

3.5.4.2. PAR-4/LKB1 et le cancer

Chez l'humain, il a été proposé que LKB1 puisse agir à titre de suppresseur tumoral pour prévenir le développement du syndrome de Peutz-Jeghers [87, 105, 116-120]. En effet, la perte de l'activité de *lkb1* peut mener à cette maladie autosomale dominante [100, 118, 119], ce qui mène éventuellement à la formation de tumeurs gastro-intestinales, ovariennes ou testiculaires, entre autres [121-125]. Dans 90% des cas, elle peut mener au développement d'un cancer [126], par exemple dans le foie [127] ou dans divers tissus épithéliaux tels que le colon [121], le sein [128, 129], l'utérus [130], les poumons [131-136], le pancréas [137, 138] ou la peau [136]. Cela a fait du syndrome de Peutz-Jeghers la première maladie susceptible de développer un cancer dont la cause est une perte de fonction d'une protéine kinase [100].

L'interaction de LKB1 avec STRAD, l'homologue humain de *strd-1* qui interagit avec *par-4* pour réguler l'activité d'AMPK, serait conservée chez l'humain et permettrait l'activité de suppression tumorale de *lkb1* [111, 137]. En effet, le rôle de l'AMPK dans l'inhibition du complexe mTORC1 et de ses cibles pourrait expliquer son effet en tant que suppresseur de tumeurs [136]. Dans de nombreux cas de cancers, des mutations chez *lkb1* semblent être plus fréquentes que chez l'AMPK, ce qui pourrait s'expliquer par la redondance des gènes codant pour les sous-unités de l'AMPK [106].

Les homologues de LKB1 chez *C. elegans* et la drosophile jouant des rôles importants dans l'établissement de la polarité, il est légitime de formuler que la fonction principale de LKB1 dans le contrôle tumoral soit liée à son rôle dans la polarité cellulaire [104, 138]. Comprendre le rôle de PAR-4 dans chacun des processus régissant la polarité permettrait de comprendre le rôle de LKB1 dans la régulation de la polarité cellulaire, ainsi que les mécanismes la gouvernant.

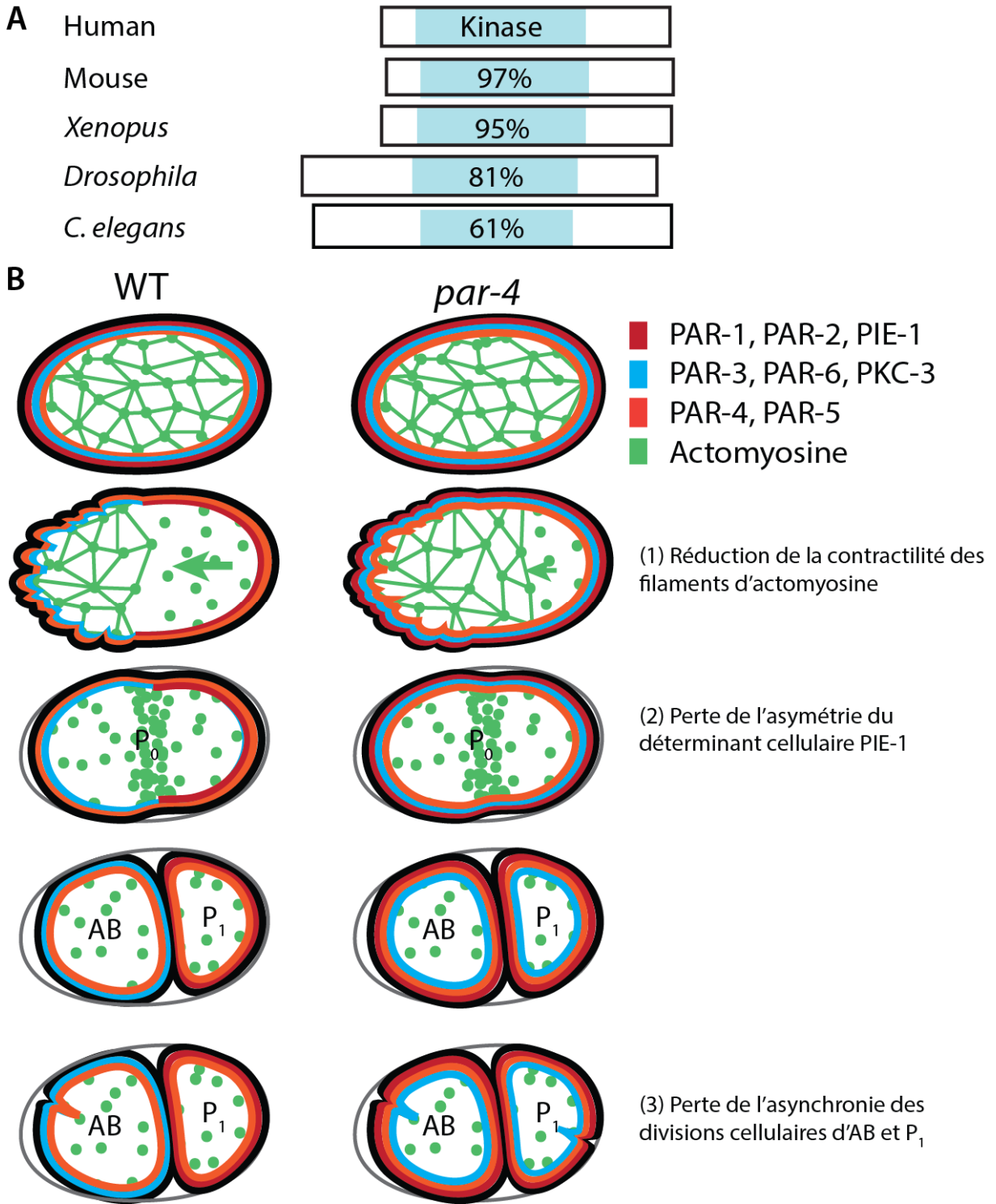


FIGURE 1.7. RÔLE DE PAR-4 DANS L'ÉTABLISSEMENT DE LA POLARITÉ CELLULAIRE DE L'EMBRYON PRÉCOCE DE *C. ELEGANS*

(A) PAR-4/LKB1 est une sérine/thréonine kinase très bien conservée. (B) *par-4* joue un rôle dans trois processus pour réguler la polarité : (1) la contractilité de l'actomyosine corticale, (2) la ségrégation asymétrique des déterminants cellulaires, par exemple PIE-1 et (3) la division cellulaire asynchrone des blastomères AB et P1.

4. CRIBLAGE PANGÉNOMIQUE DE SUPPRESSEURS DE LÉTALITÉ DE MUTANTS *PAR-4*

Chez *C. elegans*, *par-4* est nécessaire pour l'établissement de la polarité de l'embryon précoce [81]. En effet, lorsque *par-4* est muté, l'embryon ne se divise pas asymétriquement et meurt. Cependant, les processus par lesquels *par-4* régite la polarité demeurent inexplorés. Dans le but de comprendre comment PAR-4/LKB1 régule la division cellulaire asymétrique, notre équipe a tenté d'identifier des gènes qui, lorsque déplétés, supprimaient la létalité dans un mutant *par-4*. Nous avons donc procédé à un criblage par ARNi en employant la souche thermosensible *par-4(it57)* à la température semi-permissive de 18°C. Pour effectuer notre criblage, nous avons utilisé la librairie d'ARNi d'Ahringer, qui contient 16 256 clones bactériens [139]. En triplicata, nous avons déposé des nématodes *par-4(it57)* en stade L4 dans des puitsensemencés avec les bactéries exprimant les vecteurs nécessaires et les avons laissés pondre durant 72h à 18°C. Le vecteur vide L4440 ne montrant aucun effet sur le développement embryonnaire, des bactéries exprimant un vecteur contenant ce gène ont été utilisées comme témoin négatif. Nous avons estimé les niveaux de suppression de la létalité en observant la présence de larves en stade L1 dans le milieu sous un microscope de dissection. L'expérience a été répétée trois fois pour valider les résultats. Pour plus de détails, consulter la section Matériel et méthodes du Chapitre 3.

4.1. Interférence par ARNs (ARNi)

L'ARNi (interférence par ARN) consiste à promouvoir l'incorporation d'ARNdb (ARN double brin), synthétisés à partir d'un plasmide, chez un nématode *C. elegans* afin de détruire l'ARNm de certains gènes et ainsi empêcher leur expression. Les plasmides sont exprimés dans des clones bactériens. L'ARN incorporé est ensuite dégradé en ARNsi dans l'embryon. L'hybridation des ARNsi avec les ARNm endogènes correspondants est effectuée via RISC (*RNA-induced silencing complex*), un complexe protéique composé de protéines argonautes [140]. Cela mène à la dégradation de l'ARNm, empêchant ainsi sa traduction. L'expression du gène endogène est donc grandement réduite [141, 142].

L'interférence par ARN est une méthode simple et très efficace pour enrayer la fonction des gènes chez *C. elegans*. Il est possible d'administrer l'ARN double brin par injection, par

immersion [143] ou par voie alimentaire [141, 144, 145]. Nous avons opté pour la troisième méthode, car nous disposons déjà des bactéries contenant les plasmides nécessaires.

4.2. Résultats

Nos premiers résultats ont permis d'identifier 981 gènes potentiels. Nous avons ensuite confirmé 25 suppresseurs potentiels, puis identifié 6 gènes comme suppresseurs de la létalité de *par-4(it57)* : *rskn-1*, *mus-101*, *ani-2*, *fkb-6*, *ubr-1* et *aex-5*. Nous avons analysé les fonctions de ces gènes pour déterminer comment ils pourraient interagir avec *par-4* pour réguler l'établissement de la polarité embryonnaire.

4.2.1. Les kinases RSKN-1 et MPK-1

RSKN-1 est l'orthologue de la kinase à sérine/thréonine humaine RSK1. RSK1 est une kinase ribosomale S6 de la famille p90 [146]. Il existe deux familles de kinases ribosomales S6. La famille p70 est nommée S6-H1 Kinase et n'est pas très bien caractérisée. La famille p90 est phosphorylée et activée par les MAP kinases et joue un rôle dans de nombreux processus cellulaires, tels que la traduction ou le métabolisme. Elle possède deux domaines kinases différents [147]. Puisque chez l'humain, RSK1 est phosphorylée par la MAP kinase ERK2, nous avons supposé que la déplétion de l'orthologue d'ERK2 chez *C. elegans*, MPK-1, pourrait aussi supprimer la létalité embryonnaire dans un mutant *par-4*. En effet, nous avons trouvé que lorsque nous déplaçons *mpk-1* dans des mutants *par-4*, nous restaurons une viabilité de 57,4±20%. Cela augmente donc le nombre de suppresseurs de létalité à sept.

MPK-1, avec les autres MAP kinases, est un élément de la cascade de signalisation cellulaire régulée par Ras [148]. Sa fonction est de réguler la différenciation cellulaire et le développement [149]. Dans l'embryon de *C. elegans*, MPK-1 agit comme un antagoniste de PAR-1 pour réguler la localisation du déterminant cellulaire PIE-1 via MEX-5/6, mais le mécanisme régulant cette interaction demeure non caractérisé [150].

4.2.2. L'immunophiline FKB-6

FKB-6 est l'orthologue de l'immunophiline HSP56, une protéine peptidyl-prolyl cis-trans isomérase [151]. Les immunophilines sont peu caractérisées, mais leurs rôles dans la signalisation des récepteurs à stéroïdes et à androgènes ou dans le développement ont été étudiés. Un sous-groupe d'immunophilines possède des domaines contenant des répétitions de motifs tétratricopeptide (TPR), qui lui permettent d'interagir avec la protéine chaperon HSP90 pour réguler son activité [152-154]. FKB-6 est exprimée durant tout le développement de *C. elegans*,

particulièrement dans les neurones adultes dorsaux et ventraux. Elle est la seule immunophiline contenant un domaine TPR chez *C. elegans* [151]. Elle possède également deux domaines FKBP (FK506 *binding-protein*) en N-terminal, qui lui permettent probablement de se lier à des médicaments immunosuppresseurs tels que la rapamycine ou FK506 [151, 155]. Lorsque la rapamycine et les FKBP interagissent, il s'ensuit une inhibition de la voie de signalisation de mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*) et un arrêt du cycle cellulaire [156].

Chez *C. elegans*, DAF-21, l'isoforme de HSP90, est nécessaire pour le développement du ver [157]. Cependant, DAF-21 et FKB-6 ne semblent pas interagir ensemble physiquement [151]. La déplétion de *fkf-6* peut mener entre autres à de la létalité embryonnaire, suggérant un rôle durant le développement de l'embryon plutôt que dans le repliement des protéines [151, 158]. Il a d'ailleurs déjà été démontré que la déplétion de *fkf-6* supprime la létalité embryonnaire dans des mutants *par-4* [159], mais leur interaction n'a pas été caractérisée.

4.2.3. La proprotéine convertase AEX-5

AEX-5 (*Aboc (Anterior BODy Contraction) and EXPulsion defective*) est une proprotéine convertase pseudo-Kex2. Elle est impliquée dans la défécation et dans la locomotion [160].

4.2.3.1. Mécanisme de défécation

Le ver adulte défèque environ toutes les 45 secondes [161-163]. Chaque cycle de défécation est constitué de trois phases. La première, *pboc (Posterior BODy Contraction)*, consiste en la contraction des muscles postérieurs du ver. Elle est suivie de la phase *aboc*, où les muscles antérieurs se contractent. Finalement, il y a expulsion des fèces en contractant les muscles du sphincter [164]. La transmission du signal de défécation passe par les neurones moteurs GABAergiques AVL et DVB. AVL est nécessaire pour activer les mouvements *aboc* et expulsatoire alors que DVB n'active que l'expulsion. *pboc* aurait besoin d'un signal non neuronal pour être activé [165].

Trois types de mutants causant des problèmes dans la défécation ont été découverts [164] : *pboc*, *exp* et *aex*. Les mutants *pboc* montrent un défaut ou une absence de contraction postérieure, alors que les mutants *exp* ont des erreurs dans la phase d'expulsion. Les mutants *aex* montrent à la fois des défauts dans la phase *aboc* et dans l'expulsion, ce qui suggère un défaut dans la transmission du signal de contraction via les neurones AVL et DVB. Il existe six gènes *aex* chez *C. elegans* [164].

AEX-3 serait l'homologue d'une GEF de Rab3 et interagirait donc avec les petites GTPases associées aux vésicules, RAB-3 et RAB-27/AEX-6, pour réguler la relâche des vésicules synaptiques [166, 167]. AEX-1 est une protéine à domaine C2 qui régule l'activité pré-synaptique et la localisation d'UNC-13, une protéine de fusion des vésicules synaptiques. Elle serait activée par des neuropeptides clivés par la proprotéine convertase (décrit en 4.2.3.2. Proprotéines convertases) AEX-5 [168, 169]. AEX-5 est exprimée dans l'intestin, d'où elle est excrétée dans des vésicules nommées coelomocytes, avec l'aide d'AEX-4, l'homologue humain de SNAP25 [160] (Figure 1.8). SNAP25 est une protéine SNARE (*SNAP REceptor*). Elle permet la fusion spécifique des membranes des vésicules dans les synapses grâce à une hélice amphiphile dans son domaine N-terminal et à son interaction avec les complexines [170-173]. AEX-5 agit ensuite sur le GPCR (récepteur couplé aux protéines G) AEX-2 exprimé à la surface des neurones moteurs pour activer une voie de signalisation $G_s(\alpha)$ et ainsi réguler le mouvement antérieur et l'expulsion lors de la défécation [160].

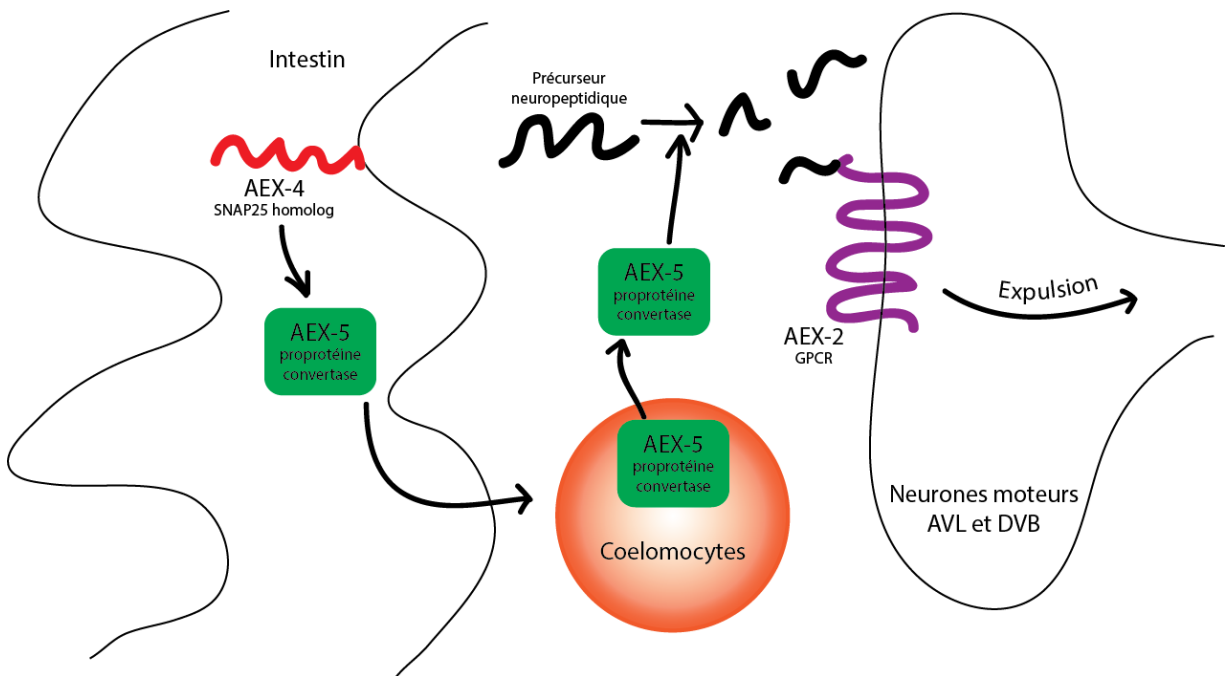


FIGURE 1.8. VOIE DE SIGNALISATION D'AEX-5 DANS LA RÉGULATION DE LA DÉFÉCATION

4.2.3.2. Proprotéines convertases

Les PC (proprotéines convertases) sont des protéases qui clivent des précurseurs peptidiques pour les activer. Elles possèdent en N-terminal un signal peptidique, suivi d'un domaine catalytique très similaire à celui des subtilisines bactériennes, qui contient la triade

catalytique Asp-His-Ser et un oxyanion Asn 1-9. Les PC eucaryotes possèdent également un domaine-P en C-terminal qui n'existe pas chez les procaryotes [174, 175]. Le rôle exact du domaine-P demeure incertain, mais il a été suggéré qu'il pourrait agir comme protéine chaperon pour permettre le repliement du zymogène et l'auto-activation de la proPC [175-177]. La proPC auto-clive son domaine-P pour s'activer et celui-ci agit alors comme inhibiteur de l'activité protéase [176]. Les PC clivent un motif monobasique ou dibasique [178, 179].

La première PC découverte fût l'endopeptidase KEX2, chez la *S. cerevisiae*. Elle clive des proséquences contenant des paires d'acides aminés basiques [180, 181]. Chez l'humain, neuf PC ont été caractérisées. Sept d'entre elles, PC1, PC2, la furine, PACE4, PC4, PC5 et PC7, clivent après des résidus Arg [182]. PC1, PC2 et la forme soluble de PC5 sont localisées dans des granules sécrétoires [183, 184].

Chez *C. elegans*, il existe quatre PC. KPC-1 et BLI-4/KPC-4 possèdent des structures similaires à PC5/6, à PACE4 et à la furine. Ces dernières clivent généralement à des sites R-X-K ou R-R [185]. EGL-3/KPC-2 est similaire à PC2 et semblent cliver suite aux même motifs dibasiques, soit K-R* ou R-R* [186]. Leurs fonctions semblent également similaires, puisque toutes deux activent des précurseurs neuronaux ou hormonaux [187]. Les sources divergent pour identifier des homologues d'AEX-5/KPC-3. Certains proposent qu'elle soit plus près de PC7 et de KEX2 de la levure [187], alors que d'autres suggèrent qu'elle soit plus près évolutivement des furines [188] ou PC1, PC3 et PC7 [168]. Il est donc difficile de prédire quels motifs sont reconnus par AEX-5. Elle n'a également pas de substrat connu. Cependant, la famille de gènes *nlp* codant pour 11 préproprotéines neuropeptidiques pourrait être un substrat potentiel d'AEX-5 dans la régulation de la défécation. Ces gènes possèdent une grande homologie chez plusieurs espèces et sont exprimés dans les neurones [189].

4.2.4. L'E3 ubiquitine ligase UBR-1

Par homologie de séquences, UBR-1 est l'orthologue de l'E3 ubiquitine ligase humaine UBR2. Très peu d'informations concernant *ubr-1* sont disponibles chez *C. elegans*. Chez *S. cerevisiae*, UBR1 est une protéine à doigt de zinc RING E3 ubiquitine ligase qui se lie à l'enzyme E2 de conjugaison à l'ubiquitine RAD6/UBC1 [190]. Elles joueraient ensemble un rôle dans la régulation de la transcription des gènes [191].

Les ubiquitine ligases fonctionnent en cascade E1, E2 et E3 [192]. Leur rôle est d'attacher des protéines d'ubiquitine à des lysines de protéines cibles pour engendrer des voies de

signalisation qui régulent notamment leur dégradation par protéolyse, le trafic cellulaire ou le cycle cellulaire [193]. Par exemple, une protéine avec une chaîne de poly-ubiquitine sera envoyée au protéasome pour être dégradée [194]. L'enzyme E1 est une protéine activatrice qui se lie à l'ubiquitine par un lien thioester. L'enzyme de conjugaison E2 catalyse alors le transfert de l'ubiquitine sur son propre site actif. Finalement, l'enzyme de liaison E3 reconnaît le substrat et transfère l'ubiquitine sur celui-ci [195].

4.2.5. La protéine de liaison à la topoisomérase II MUS-101

mus-101 code pour une protéine homologue à TOPBP1, une protéine se liant à la topoisomérase pour réguler l'initiation de la réplication. *mus-101* est essentielle pour la réplication de l'ADN, puisqu'il s'agit d'un facteur important dans la réponse face aux dommages à l'ADN [196]. MUS-101 possède six répétitions de motifs BRCA1 dans son domaine C-terminal. Elle est SUMOylée *in vitro* par GEI-17, une E3 SUMO ligase. Il a donc été proposé que cette modification permette de promouvoir la réplication de l'ADN dans des conditions stressantes [196].

4.2.6. La protéine d'échafaudage ANI-2

L'actomyosine est liée à RhoA par l'entremise d'une protéine d'échafaudage nommée anilline [197] (Voir 3.1. Contraction du cortex; Figure 1.6). L'anilline joue plusieurs rôles dans la structure du cytosquelette de l'embryon. Notamment, elle permet de recruter la septine, normalement assemblée sous forme d'anneaux, sur les filaments d'actine pour en créer des agglomérations [198]. L'anilline est localisée dans le noyau des cellules durant l'interphase et elle se retrouve dans le cytoplasme et dans le cortex durant la métaphase. À l'anaphase, elle est co-localisée avec la myosine au site de clivage de la cellule. L'anilline est également localisée au cortex dans les tissus syncytiaux, tels que la gonade de *C. elegans* [199].

Chez *C. elegans*, il existe trois isoformes de l'anilline (Figure 1.9). ANI-1, la forme canonique, est le seul de ces trois isoformes qui possède les quatre domaines d'homologie retrouvés dans l'anilline humaine. Dans son domaine C-terminal, l'anilline possède deux domaines très bien conservés, soit un domaine AH d'homologie à l'anilline et un domaine PH d'homologie à la pleckstrine [197, 200]. Le domaine AH permet l'interaction directe de l'anilline avec RhoA, alors que le domaine PH permet sa liaison aux septines et au cortex. Ces deux domaines sont nécessaires à l'activité et à la localisation d'ANI-2. Dans son domaine N-terminal, l'anilline possède deux autres domaines pour permettre sa liaison à l'actine et à la myosine, respectivement [199, 201]. L'anilline permet de réguler l'activité contractile de la myosine [201]. La myosine et l'anilline sont recrutées de manière indépendante et leur liaison ensemble est régulée par la phosphorylation de la chaîne

légère de la myosine [201]. ANI-1 joue un rôle dans la contraction du cortex suite à la fertilisation et dans le pseudo-clivage durant la cytokinèse, entre autres en recrutant les septines à l'anneau contractile durant la division cellulaire [202, 203]. ANI-2 et ANI-3 ne montrent pas d'homologie de séquences pour les domaines de liaison à l'actine ou à la myosine, mais elles possèdent les domaines AH et PH en C-terminal [202]. Nous avons précédemment établi un modèle selon lequel ANI-2 agirait comme dominant-négatif et régulerait la contractilité corticale de l'embryon en compétitionnant avec ANI-1. Cette compétition serait prévenue par PAR-4 [101].

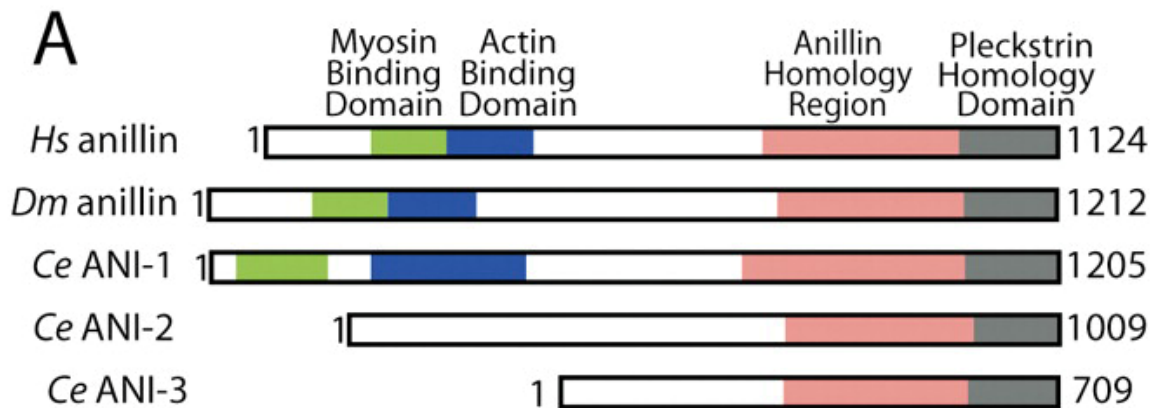


FIGURE 1.9. DOMAINES FONCTIONNELS DE L'ANILLINE [202]

RATIONALISATION DU PROJET

L'établissement et le maintien de la polarité cellulaire sont des propriétés essentielles chez la plupart des cellules. L'embryon précoce de *C. elegans* est un modèle idéal pour étudier la polarité cellulaire et le rôle qu'y tient PAR-4/LKB1, car il présente une polarisation dans l'axe antéro-postérieur.

Chez *C. elegans*, la polarisation embryonnaire s'effectue grâce à une régulation asymétrique de la contractilité de la myosine au cortex de l'embryon. Cette asymétrie contractile mène à une réorganisation du cytosquelette, qui permet dès lors de localiser asymétriquement les protéines PAR dont la fonction de polarisation cellulaire est conservée chez tous les métazoaires. Les protéines PAR promeuvent la division asymétrique de l'embryon en deux blastomères de tailles différentes, l'antérieur AB et le postérieur P1. La division de ces blastomères est asynchrone, la cellule antérieure AB se divisant environ deux minutes avant P1. Les divisions d'AB mènent à la formation de l'ectoderme, alors que celles de P1 engendrent la formation de l'endoderme et de la lignée germinale.

PAR-4 est l'orthologue du suppresseur tumoral humain LKB1 chez *C. elegans*. Chez *C. elegans*, une mutation du gène *par-4* empêche la division asymétrique en perturbant principalement trois processus cellulaires, soit :

- la ségrégation asymétrique des déterminants cellulaires [89],
- la régulation asynchrone du cycle cellulaire et [204],
- la contractilité des filaments d'actomyosine [32, 101].

PAR-4 promeut la mobilité corticale de la myosine durant la polarisation de l'embryon, favorisant ainsi la contractilité cellulaire et la ségrégation asymétrique des autres protéines PAR. PAR-4 favorise ainsi l'accumulation au pôle postérieur et l'activation par phosphorylation de PAR-1, une kinase de type sérine/thréonine impliquée dans la ségrégation des déterminants et la régulation du cycle cellulaire. Une perte de *par-4* est donc létale pour l'embryon. La cellule P1 n'étant pas correctement constituée, la différenciation des cellules intestinales n'a pas lieu, ce qui pourrait être la cause de la létalité embryonnaire. PAR-4 régule aussi l'activité de l'AMP kinase dans la prolifération des cellules germinales, mais cette voie n'est pas active dans l'embryon [102].

Dans le but de mieux comprendre *par-4* et son rôle dans l'établissement de la polarité, nous avons effectué un criblage pangénomique par interférence à l'ARN double brin pour identifier de

nouveaux gènes agissant avec *par-4*. Ce criblage a mené à l'identification de sept suppresseurs de la létalité causée par une mutation de *par-4* : *ani-2*, *mus-101*, *mpk-1*, *rskn-1*, *aex-5*, *ubr-1* et *fkb-6*. Des études menées par le Dr Chartier ont permis de localiser ANI-2 dans la contractilité corticale [101].

HYPOTHÈSE

Seulement trois voies de régulation de la polarité de l'embryon impliquant *par-4* ont été découvertes jusqu'à présent, soit : la ségrégation asymétrique des déterminants cellulaires [89], la régulation asynchrone du cycle cellulaire [204] et la contractilité des filaments d'actomyosine [32, 101] (Figure 1.10). **Nous supposons donc que les sept gènes suppresseurs de la létalité embryonnaire identifiés précédemment jouent tous un rôle dans au moins une de ces voies.**

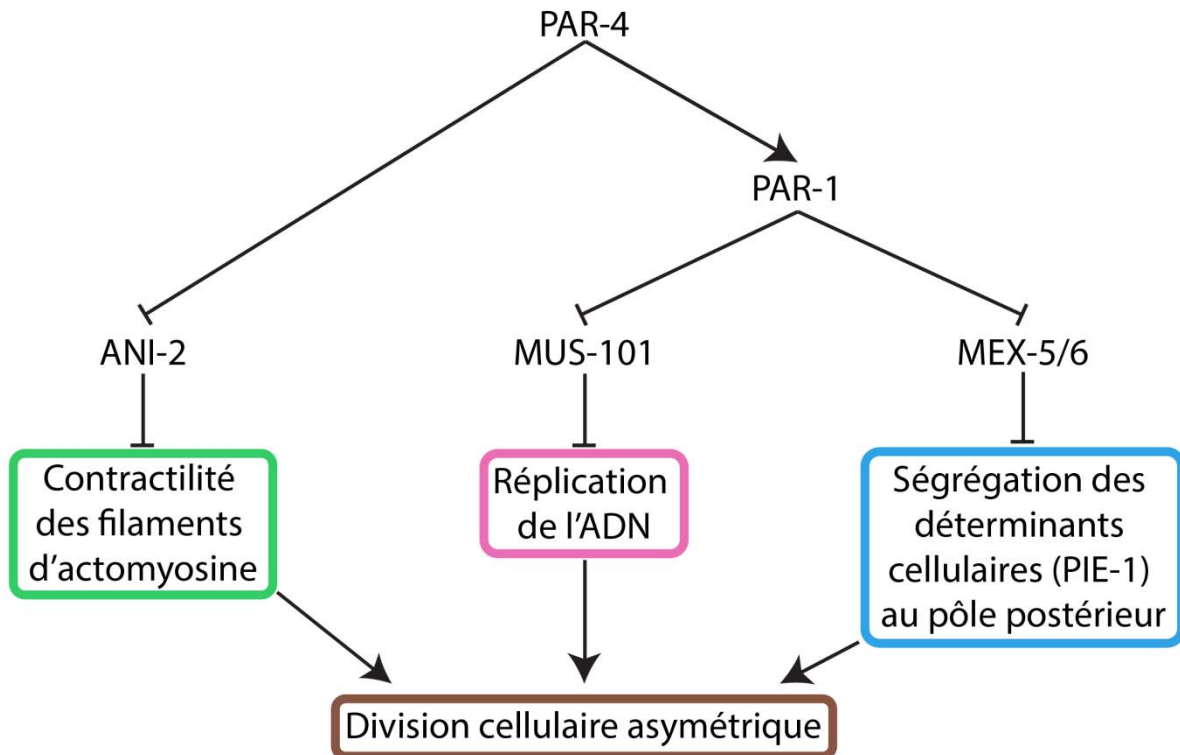


FIGURE 1.10. VOIES DE SIGNALISATION DE PAR-4/LKB1 CHEZ C.ELEGANS

OBJECTIFS DE RECHERCHE

Mon projet de maîtrise consiste à positionner ces suppresseurs dans la voie de signalisation de PAR-4, dans le but de révéler des détails moléculaires sur les différents événements cellulaires dépendants de la fonction de cette kinase.

Ce but est accompli à travers deux objectifs spécifiques :

- 1) Procéder à l'**analyse fonctionnelle** des suppresseurs de *par-4*. Ce premier objectif consiste à dépléter par interférence à l'ARN les suppresseurs identifiés précédemment et à mesurer l'effet de ces déplétions sur les voies de signalisation contrôlées spécifiquement par PAR-4. Le laboratoire a précédemment mis au point des méthodes d'analyse qui permettent de rapporter l'activité de PAR-4 dans les trois processus de polarité cellulaire PAR-4-dépendants mentionnés ci-haut (ségrégation de déterminants, cycle cellulaire, contractilité). Cette étude nécessite l'utilisation de méthodes d'imagerie en temps réel et d'analyse quantitative d'images. L'analyse phénotypique des embryons déplétés permet de positionner fonctionnellement les gènes suppresseurs par rapport à PAR-4 grâce à des règles simples d'épistasie génétique.
- 2) Définir le **rôle** de chacun des suppresseurs de létalité dans les voies régies par *par-4* lors de la polarisation de l'embryon. Ce second objectif permettrait d'élucider les changements dans les événements de polarité causés par la déplétion des gènes suppresseurs lors de l'embryogénèse, de façon à déterminer comment ceux-ci contrôle la division cellulaire asymétrique.

CHAPITRE 2

ARTICLE 1 : PAR-4/LKB1 REGULATES DNA REPLICATION DURING ASYNCHRONOUS DIVISION OF THE EARLY *C. ELEGANS* EMBRYO

Le manuscrit présente les résultats portant sur *par-4* et *mus-101* et leur rôle dans l'asynchronie des divisions cellulaires. Il a été publié dans le Journal of Cell Biology en mai 2014, dans le volume 205, aux pages 447-55.

Dr Laura Benkemoun est la principale investigatrice du projet. Catherine Descoteaux et Dr Nicolas T. Chartier ont contribué aux analyses phénotypiques et aux idées, ainsi qu'à la rédaction de l'article.

PAR-4/LKB1 regulates DNA replication during asynchronous division of the early *C. elegans* embryo

Laura Benkemoun¹, Catherine Descoteaux¹, Nicolas T. Chartier¹, Lionel Pintard³, Jean-Claude Labbé^{1,2}

¹Cell Division and Differentiation Laboratory, Institute of Research in Immunology and Cancer, and

²Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada

³Institut Jacques Monod, Centre National de la Recherche Scientifique and Université Paris Diderot, F-75013 Paris, France

Corresponding author:

Laura Benkemoun

Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC)

Université de Montréal

C.P. 6128, Succ Centre-ville Montréal, QC H3C 3J7 Canada

Phone : (514) 343-7893

Fax : (514) 343-6843

Abbreviations used in this paper: AMPK, AMP kinase; DIC, differential interference contrast.

Running head: PAR-4/LKB1 regulates DNA replication

Keywords: LKB1; DNA replication; Cell cycle regulation; Asymmetric cell division; PAR protein signalling.

Number of characters: 19,905

©Benkemoun et al., 2014. Originally published in *Journal of Cell Biology*. Doi: 10.1083/jcb.201312029.

ABSTRACT

Regulation of cell cycle duration is critical during development, yet the underlying molecular mechanisms are still poorly understood. The two-cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo divides asynchronously and thus provides a powerful context in which to study regulation of cell cycle timing during development. Using genetic analysis and high-resolution imaging, we found that deoxyribonucleic acid (DNA) replication is asymmetrically regulated in the two-cell stage embryo and that the PAR-4 and PAR-1 polarity proteins dampen DNA replication dynamics specifically in the posterior blastomere, independently of regulators previously implicated in the control of cell cycle timing. Our results demonstrate that accurate control of DNA replication is crucial during *C. elegans* early embryonic development and further provide a novel mechanism by which PAR proteins control cell cycle progression during asynchronous cell division.

INTRODUCTION

Asymmetric division of the *Caenorhabditis elegans* embryo is controlled by PAR polarity proteins and results in the early partitioning of determinants that promote differential cell fates and asynchronous division of the two-cell stage blastomeres (Fig. 1 A)[205, 206]. Although the mechanism regulating cell cycle asynchrony remains unclear, it was previously shown to rely on two molecular pathways downstream of PAR proteins. One pathway promotes a delay in S-phase progression in the posterior cell (the P1 blastomere) by the preferential activation of DNA replication checkpoint regulators, an event proposed to derive from a difference in blastomere size [65]. The other pathway relies on faster mitotic entry in the anterior cell (the AB blastomere) via the preferential anterior enrichment of the mitotic regulators PLK-1 and CDC-25.1 [77, 78]. Embryos produced by homozygous mutants for *par* genes (hereafter referred to as *par* mutant embryos) largely fail to asymmetrically localize cell fate determinants at first mitosis and, accordingly, generate two blastomeres that aberrantly divide synchronously [205]. However, in two-cell embryos mutant for the genes *par-4* or *par-1*, the blastomeres divide synchronously despite having unequal sizes, and the anterior blastomere has wild-type cell cycle duration despite defects in PLK-1 and CDC-25.1 segregation [77, 78, 89]. These results suggest that PAR-4 and PAR-1 control additional mechanisms to regulate asynchronous division of the early *C. elegans* embryo.

RESULTS AND DISCUSSION

The function of PAR-4 in cell cycle regulation relies on a MUS-101-dependent activity

par-4 encodes the *C. elegans* orthologue of the human tumor suppressor kinase LKB1 (also known as STK11) and was proposed to phosphorylate and activate PAR-1, a serine/threonine kinase of the MARK (MAP/microtubule affinity-regulating kinase) family [82, 85, 86, 207]. We sought to identify regulators of asynchronous cell division by studying genetic interactors of *par-4*. We uncovered the gene *mus-101* in an RNAi-based screen for suppressors of embryonic lethality resulting from partial loss of *par-4* function (unpublished data). At the semipermissive temperature of 18°C, *par-4(it47ts)* mutant animals produce 13% of hatching embryos as compared with 100% for wild-type controls (Table 1). Depleting MUS-101 by RNAi in *par-4(it47ts)* animals resulted in 52% hatching progeny, a fourfold increase from *par-4* mutant animals treated with control RNAi. Likewise, at 20°C, the viability of *par-4(it47ts)* embryos was enhanced by 20-fold after depletion of MUS-101 by RNAi (Table 1). Decreasing *mus-101* gene dosage by half (using animals heterozygote for the presumptive null *mus-101(tm1761)* allele) in otherwise *par-4(it47ts)* mutant animals also significantly increased embryonic viability at 18°C (Table 1). The depletion of MUS-101 by RNAi in *par-4(it47ts);mus-101(tm1761)/+* double mutant animals further increased viability in the progeny (Table 1). However, depleting MUS-101 at the fully restrictive temperature of 25°C could not restore viability in *par-4* mutants, indicating that residual PAR-4 activity is required to allow suppression at lower temperatures. Suppression of embryonic lethality by depletion of MUS-101 was also observed in similar assays using a different mutant allele of *par-4(it57ts)*; unpublished data). These results indicate that *mus-101* is a specific suppressor of *par-4* embryonic lethality and that the activity of these two genes may be in a balanced regulation.

To understand how PAR-4 and MUS-101 function together, we assessed which *par-4(it47ts)*-dependent defects were restored by depletion of MUS-101. The embryonic defects associated with mutations in *par-4* include the mislocalization of cell fate determinants [81], a decrease in actomyosin dynamics during polarization and cytokinesis [101], and a loss of cell cycle asynchrony at the two-cell stage [89]. We found that depleting MUS-101 at semipermissive temperature largely failed to restore proper localization of cell fate determinants (Fig. S1 A), or actomyosin dynamics (Fig. S1B and C) in *par-4(it47ts)* embryos, indicating that MUS-101 mainly acts independently of these processes. However, depletion of MUS-101 resulted in a significant increase in cell cycle asynchrony in two-cell stage *par-4(it47ts)* embryos when compared with control, even in conditions in which depletion of MUS-101 had no effect on cell cycle progression

in wild type embryos (such as *par-4(it47ts); mus-101(tm1761)/+* double mutant animals; Fig. 1 B). This suggests that PAR-4 and MUS-101 act together to regulate cell cycle duration.

Previous studies have demonstrated that asynchrony of division at the two-cell stage is caused by a longer S-phase duration of the posterior blastomere P1 relative to that of the anterior AB blastomere [65, 208]. In *par-4* mutants, S phase is accelerated in the P1-like blastomere, thus resulting in an aberrant situation in which the two blastomeres divide at the same time (Fig. 1, B and C)[78]. Reduced MUS-101 levels using either heterozygous animals or *mus-101* (RNAi) resulted in a specific increase in S-phase duration of the posterior blastomere of *par-4* mutant embryos and had no apparent effect on the anterior blastomere (Fig. 1 C). These results indicate that MUS-101 functions with PAR-4 to regulate S-phase progression in the posterior blastomere during asynchronous division of the two-cell stage embryo. The lack of observed defect in the anterior blastomere further suggests that these two proteins regulate cell cycle progression specifically in P1.

MUS-101 suppresses *par-4* cell cycle timing defects through its function in DNA replication

MUS-101 is the *C. elegans* orthologue of human TopBP1 and budding yeast Dpb11p [196]. Previous studies have revealed that these ortholog proteins have two main cellular functions: they promote the initiation of DNA replication and regulate the activity of the DNA replication checkpoint [209-211]. To assess whether MUS-101 functions with PAR-4 through its role in DNA replication, we asked whether RNAi depletion of other regulators of DNA replication initiation restores cell cycle asynchrony in *par-4* mutant embryos. In *C. elegans*, the initiation of DNA replication largely occurs as previously described in other organisms, and most regulators have a clear orthologue that is incorporated into the replisome following a well-defined, hierarchical order (Table S1) [12, 212]. Of the 13 other regulators of DNA replication initiation that were tested, RNAi depletion of 11 of them could significantly increase cell cycle asynchrony between AB-like and P1-like blastomeres in *par-4* mutant embryos (Fig. 2 A). Notably, depleting some of these regulators in wild-type embryos resulted in a lengthening of cell cycle asynchrony (Fig. 2 A), suggesting, as previously reported [65], that the activity of the DNA replication checkpoint pathway is increased in these conditions. However, a lengthening of cell cycle asynchrony in wild-type embryos was not necessarily coupled to suppression of *par-4* cell cycle timing defects. For instance, whereas MCM-7 depletion increased cell cycle asynchrony between AB and P1 blastomeres in wild-type embryos, it had no effect in *par-4(it47ts)* embryos (Fig. 2 A). Conversely, CDC-7 depletion had no effect in the wild type but significantly increased cell cycle asynchrony in *par-4(it47ts)* embryos. This suggests that hyperactivation of the DNA replication checkpoint is not the direct cause of the *par-4* suppression phenotype. Accordingly, depletion of the ATL-1 or CHK-1 checkpoint regulators failed to suppress the cell cycle timing defect of *par-4* mutant embryos, and depleting these regulators in *par-4(it47ts); mus-101(tm1761)/+* double mutant animals did not preclude the suppression of cell cycle asynchrony defects at the embryonic two-cell stage (Fig. 2 B). Collectively, these results indicate that depleting regulators of DNA replication can suppress the cell cycle timing defects of *par-4* mutant embryos and support the notion that MUS-101 modulates PAR-4 function through its role in DNA replication, independently of the DNA replication checkpoint.

PAR-4 asymmetrically regulates DNA replication

The functional relationship that we uncovered between PAR-4 and MUS-101 suggests that PAR-4 may control cell cycle asynchrony at the two-cell stage by differentially regulating DNA replication in the two blastomeres. To test this hypothesis, we developed an imaging-based assay to measure the dynamics of DNA replication in the *C. elegans* two-cell stage embryo. The assay relies on monitoring transgenically expressed PCN-1, the *C. elegans* orthologue of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) [65], fused to GFP (see Materials and methods; Fig. 3A). PCNA functions as a processivity factor for DNA replication and is one of the last components incorporated into the replisome upon replication origin firing [213]. Importantly, its accumulation in nuclear foci in other organisms was previously demonstrated to report on the active sites of DNA replication [214, 215].

Images of two-cell stage embryos expressing GFP::PCN-1 were acquired, and nuclear sites enriched in GFP::PCN-1 were revealed by applying various fluorescence thresholds on deconvolved images (Figs. 3 A and S2 A). With this approach, low thresholds revealed the total nuclear pool of GFP::PCN-1, whereas high thresholds highlighted the nuclear regions enriched in GFP::PCN-1, in which the number of replication forks is proportionally higher (Figs. 3 B and S2 A). The relative engagement in DNA replication between the two blastomeres at each time point was determined by measuring the percentage of nuclear area comprising GFP::PCN-1 foci in each cell, using a previously described algorithm [216].

In control embryos, applying low fluorescence thresholds (0–20%) revealed a comparable nuclear area enriched in GFP::PCN-1 between AB and P1 blastomeres at any time point, and a decrease in fluorescence intensities was observed at nuclear envelope breakdown (Fig. 3 B). This fraction likely corresponds to both DNA-associated and nucleoplasmic pools of GFP::PCN-1 as previously reported [65]. Applying high fluorescence thresholds (80–90%) allowed us to monitor the nuclear regions actively engaged in DNA replication and revealed significant differences between the nuclear area occupied by GFP::PCN-1 in AB and P1 blastomeres (Fig. 3 B). Specifically, GFP::PCN-1 enrichment initiated early in S phase, and maximal enrichment was reached at around the same time in AB and P1, indicating that the initial peak of DNA replication occurs concomitantly in both blastomeres. However, the AB blastomere had a significantly larger nuclear area of high GFP::PCN-1 fluorescence intensity compared with the P1 blastomere at any time point (Fig. 3 B). The ratio of high GFP::PCN-1 fluorescence intensity over distribution was equal between the two blastomeres (74 ± 10 for AB and 70 ± 9 for P1, $n = 7$; $P = 0.51$, Student's *t* test), indicating that the asymmetry in fluorescence distribution does not result from a change in DNA compaction. This

finding is consistent with a higher number of replication forks being active during early S phase in the AB blastomere compared with the posterior one. A comparable asymmetric distribution of fluorescence intensities was observed after performing this assay on embryos transgenically expressing GFP::DIV-1, the orthologue of the B subunit of the DNA polymerase α -primase complex (Fig. S2 B) [12, 217].

To ascertain that this assay faithfully monitors DNA replication, we reasoned that partially depleting regulators of DNA replication should prolong the asynchrony between the two blastomeres and significantly affect the distribution of GFP::PCN-1 at high thresholds, whereas depleting replication checkpoint regulators should shorten the duration of S phase in the P1 blastomere without significantly perturbing GFP::PCN-1 distribution in early S phase. This is what we observed. Depletion of the DNA replication factor PSF-3 lengthened the asynchrony between AB and P1 blastomeres (Fig. 2 A) and significantly increased the difference in the percentage of nuclear area occupied by GFP::PCN-1 between AB and P1 at the point of maximal enrichment as compared with the control ($P = 0.004$, Student's *t* test; Fig. 3 B). This is consistent with a preferential activation of checkpoint signaling and a defect in early DNA replication origin firing in the P1 blastomere compared with AB. Depleting the checkpoint regulator ATL-1 by RNAi caused a shortening of the time between AB and P1 nuclear envelope breakdown but no significant difference on the distribution of GFP::PCN-1 foci at high fluorescence thresholds compared with control embryos ($P = 0.63$, Student's *t* test; Fig. 3 B). This is consistent with checkpoint signaling being largely inactivated in P1 and having no effect on the firing of early DNA replication origins in early S phase. This indicates that the assay is robust and accurately reports on the dynamics of DNA replication *in vivo*, independently of DNA replication checkpoint activity.

We next used this imaging assay to test whether PAR-4 plays a role in the regulation of DNA replication dynamics at the two-cell stage. In *par-4(it47ts)* mutant animals grown at semipermissive temperature, we observed that both blastomeres have identical nuclear distributions of GFP::PCN-1 when applying a high fluorescence intensity threshold (Fig. 3 C). This indicates that DNA replication is abnormally symmetric between the two blastomeres when PAR-4 activity is compromised. As S-phase duration is shortened in the posterior blastomere of *par-4* mutant embryos (Fig. 1 C) [78], this finding is compatible with the notion that PAR-4 negatively regulates DNA replication in the P1 blastomere of wild-type embryos. Depleting the DNA replication factors MUS-101 or PSF-3 restored an asymmetry in GFP::PCN-1 nuclear distribution in *par-4(it47ts)* embryos (Fig. 3 C). Importantly, an asymmetry in GFP::PCN-1 nuclear distribution was also restored by depleting either PSF-2 or CDC-7 (Fig. 3 C), two DNA replication factors whose

depletion can suppress *par-4* defects but does not otherwise affect cell cycle timing in wild-type embryos (Fig. 2 A). As expected, GFP::PCN-1 asymmetry was not restored after depleting the replication factor CDC-7 from *par-4(it47ts)* embryos grown at fully restrictive temperature (Fig. S2 C), again indicating that residual PAR-4 activity is needed to allow suppression at lower temperatures. Together, these results reveal that DNA replication is asymmetric at the two-cell stage, with more active replication forks present in the nucleus of the early AB blastomere compared with P1 and that this asymmetry is controlled by PAR-4. Previous studies demonstrated that the mitotic regulator PLK-1 promotes asynchronous division of the two-cell embryo [77, 78], raising the possibility that PAR-4 acts through PLK-1 to regulate DNA replication at this stage. Partial depletion of PLK-1 was previously reported to restore embryonic viability in *par-4* mutants [159]. Consistently, we found that partial depletion of PLK-1 in *par-4(it47ts)* mutant animals restored cell cycle asynchrony at the two-cell stage (Fig. 3 D and not depicted). However, RNAi depletion of PLK-1 in wild-type or *par-4(it47ts)* animals had no significant effect on GFP::PCN-1 nuclear distribution between AB and P1 blastomeres when compared with control conditions (Fig. 3 D). These results indicate that PAR-4 regulates DNA replication asymmetry at the two-cell stage independently of PLK-1 activity.

PAR-1 regulates DNA replication

PAR-1, a conserved serine/threonine kinase that regulates cell polarity [85], was previously shown to be a downstream phosphorylation target of PAR-4/LKB1 in multiple species, including *C. elegans* [86, 102]. Accordingly, *par-1* mutant embryos recapitulate many of the defects observed in *par-4* mutants, including a loss of cell cycle asynchrony at the two-cell stage [81, 150]. We therefore sought to determine whether PAR-1 also regulates DNA replication during asynchronous division of the two-cell stage *C. elegans* embryo. As is the case for *par-4* mutants, we found that RNAi depletion of several regulators of DNA replication initiation could significantly increase cell cycle asynchrony between both blastomeres in *par-1(zu310ts)* mutant embryos grown at a semipermissive temperature (Fig. 2 A, light gray bars), independently of DNA replication checkpoint activity (Fig. 2 B). Furthermore, analysis of GFP::PCN-1 fluorescence distribution revealed that it is equal between the nuclei of both blastomeres in two-cell stage *par-1(zu310ts)* embryos, and depletion of PSF-2 by RNAi significantly restored asymmetric distribution of GFP::PCN-1 in these embryos (Fig. 3 E). These results indicate that, as is the case for PAR-4, PAR-1 regulates DNA replication dynamics during asynchronous division of the *C. elegans* two-cell stage embryo.

A model for the regulation of asynchronous cell division

Collectively, our results support a model in which activation of the PAR-1 kinase by PAR-4/LKB1 in the P1 blastomere of the two-cell stage embryo negatively regulates the initiation of DNA replication in early S phase. As both blastomeres have the same amount of DNA to replicate, this difference contributes to prolonged S-phase duration in P1 and asynchronous division of the two blastomeres, which was proposed to be important for proper embryonic patterning [65, 217]. The precise targeted effector in the DNA replication initiation cascade is currently unknown. In other systems, initiation of replication was reported to occur via two distinct, consecutive steps: origin licensing and origin firing [218]. Performing our replication assay on wild-type embryos transgenically expressing the licensing factors ORC-2 and CDC-6 fused to GFP revealed that they are distributed symmetrically at all times (unpublished data), suggesting that PAR-4 and PAR-1 do not function at origin licensing but rather act during the step of origin firing. In yeast, the limiting amounts of many proteins controlling origin firing was previously proposed to be key in regulating early versus late origin activation and, thereby, the timing of DNA replication initiation [219, 220]. Although a model based on limiting amounts of critical factors was previously proposed to regulate asynchronous division of the *C. elegans* embryo [65], we consider such a mechanism unlikely for DNA replication initiation factors given that *par-4* mutant blastomeres divide synchronously despite being asymmetric in size. Furthermore, we did not observe any change in cell cycle timing of the AB cell when comparing wild-type and *par-4* mutant embryos (Fig. 1 C), and antibodies against PSF-3 and MUS-101, two regulators of DNA replication origin firing [218], did not reveal any difference in levels between the two blastomeres in early S phase (Fig. S3). Our results therefore support a model in which PAR-4 and PAR-1 control the activity of one or more DNA replication factors specifically in the P1 cell. This provides a context in which the control of early versus late DNA replication origin firing may play a crucial biological role, that of allowing proper embryonic patterning through the regulation of cell cycle duration and asynchronous division.

Both PAR-1/MARK and PAR-4/LKB1 are conserved in other species, in which they also control cell polarity [221]. Furthermore, LKB1 was shown to regulate cell growth by inhibiting the mammalian target of rapamycin pathway through direct phosphorylation and activation of AMP kinase (AMPK) [105, 222]. Although AMPK was shown to regulate multiple nutrient-dependent signaling events, recent studies in mammalian cells suggested that LKB1 also controls cell proliferation independently of mammalian target of rapamycin and AMPK [136, 223, 224]. Our finding that PAR-4/LKB1 regulates DNA replication in *C. elegans* further highlights the central role of this kinase in coordinating cell polarity, cell division, and cell growth.

MATERIALS AND METHODS

Strains and alleles

C. elegans animals were maintained according to standard procedures [225] and were grown at 15°C unless otherwise stated. The wild-type strain was the N2 Bristol strain. The alleles used in this study are described in WormBase: LGI, *mus-101(tm1761)*, *lin-11(n389)* (used to balance *mus-101*); LGIII, *unc-119(ed3)*; LGV, *par-4(it47ts and it57ts)*, *par-1(zu310ts)*, *zuIs45[nmy-2p::nmy-2::GFP + unc-119(+)]*; and LG?, *axIs1462[pie-1p::GFP::pie-1 + unc-119(+)]*, *bnIs1[pie-1p::GFP::pgl-1 + unc-119(+)]*, *isIs17[pie-1p::GFP::pcn-1 + unc-119(+)]*, *gtIs66[pie-1p::GFP(lap)::div-1 + unc-119(+)]*. Strains were provided by the Japanese National Bioresource Project for *C. elegans* (Tokyo Women's Medical University School of Medicine, Tokyo, Japan) and the *Caenorhabditis* Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis, MN). The *mus-101(tm1761)* allele consists in a 598-bp deletion located 794 bp away from the first ATG and that removes the fifth and sixth exons and a 5' intron splice site. This likely results in a transcribed mRNA that is inappropriately spliced and encodes, at most, the first 194 residues of the 1,182-amino acid protein. Embryos homozygous for *mus-101 (tm1761)* hatch and grow to become sterile adults. *par-4(it47ts)*, *par-4(it57ts)*, and *par-1(zu310ts)* are thermosensitive alleles carrying a single missense mutation in the region encoding the kinase domain and produce proteins with little or no catalytic activity at restrictive temperature [82, 150].

RNAi-mediated depletions

Protein depletion by RNAi was performed by feeding animals with individual clones from the Ahringer collection, as previously described [145]. In brief, each clone was grown up to log phase and plated overnight on nematode growth medium plates containing 50 μ M carbenicillin and 1 mM IPTG. All assays were performed on embryos produced by animals grown for 48 h in the presence of a double-stranded RNA-expressing clone. Suppression of embryonic lethality was performed by counting hatching versus total progeny in at least three independent assays, as described previously [101]. Clones were systematically verified by sequencing, and empty vector (L4440) was used as a control. The efficiency of CHK-1 depletion by RNAi was confirmed by Western blotting and immunofluorescence analyses.

Time-lapse imaging of embryonic development

Time-lapse imaging of embryos expressing NMY-2::GFP and measurements of cortical velocity was performed as described previously [101]. Imaging of embryos was performed using a microscope (Swept Field Confocal; Nikon and Prairie Technologies) using the 45- μm pinhole setting and 1×1 binning on a camera (CoolSnap HQ2; Photometrics). A 100 \times /1.4 NA Plan Apochromat objective was used to acquire 16 confocal sections (separated by 0.5 μm) of the upper cortex exposed for 80 ms at 10-s intervals. All Swept Field Confocal acquisitions and additional components, including laser exposure setting, were controlled by Elements software (Nikon). ImageJ software (National Institutes of Health) was used to measure cortical velocity, by quantitating the mean anterior displacement of NMY-2::GFP cortical foci over time.

Differential interference contrast (DIC) imaging of developing embryos was performed as described previously (Hyenne et al., 2008). Images were acquired by a camera (AxioCam HRm; Carl Zeiss) mounted on a microscope (Axio Imager.Z1; Carl Zeiss), and the acquisition system was controlled by AxioVision software (Carl Zeiss). Plan Apochromat 63 \times /1.4 NA or 100 \times /1.4 NA objectives were used to acquire a single midsection of the embryo at 5-s intervals. ImageJ software was used to perform quantifications. Timing of nuclear envelope breakdown was defined by DIC as the first noticeable disappearance of nuclear membrane, and cytokinesis was defined by DIC as the first observable change in cortical organization after spindle assembly. As early blastomeres of *C. elegans* oscillate between S and M phases, the time separating cytokinesis from nuclear envelope breakdown corresponds to S phase [65, 208].

Localization of GFP::PGL-1 was performed by imaging embryos with a microscope (DeltaVision; Applied Precision) using a 60 \times Plan Apochromat objective (Olympus). Images were acquired with a camera (Cool-Snap HQ2), and the system was controlled by SoftWoRx software (Applied Precision). Localization of GFP::PIE-1 was performed by imaging embryos with the Axio Imager.Z1 microscope described in the previous paragraph. The distribution of each protein was assessed by measuring fluorescence intensities along the anteroposterior axis using ImageJ software.

Immunofluorescence

For immunofluorescence analysis, gravid hermaphrodites were cut open in 6 μ L of M9 buffer with two 25-gauge needles on a 14 \times 14-mm patterned slide (Cel-Line; Thermo Fisher Scientific) coated with 0.1% poly-l-lysine. A coverslip was placed on the sample, and the slide was placed for \geq 5 min on a metal block cooled in dry ice. The coverslip was then removed, and the slide was placed immediately in fixative (20°C methanol) for 20 min. The slide was rehydrated twice with PBS for 5 min and once with PBST (PBS with 0.1% Tween 20) for 5 min and then incubated in blocking buffer (PBST containing 10% goat serum) for 30 min at room temperature. Antibodies were then applied in blocking buffer and incubated overnight at 4°C (primary) or 1 h at room temperature (secondary), each followed by four washes of 5 min in PBST. The fixed specimens were mounted in 90% glycerol containing 1% N-propylgalate, and a coverslip was sealed. Embryos were visualized with a laser-scanning confocal microscope (LSM 510; Carl Zeiss) equipped with a 63 \times /1.4 NA Plan Achromat objective. The mouse clone OIC1D4 anti-P granules antibody (1:500; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa) was used. Rat polyclonal antisera recognizing amino acids 849–1,182 of the MUS-101 protein expressed in *Escherichia coli* as a GST fusion protein were produced by SDIX. The antisera were depleted from GST antibodies and affinity-purified using an immobilized MUS-101(849–1,182) protein fragment fused to a 6 \times His tag. Rabbit polyclonal antisera recognizing full-length PSF-3 expressed in *E. coli* as a GST fusion protein were produced by Eurogentec. Anti-PSF-3 antibodies were affinity purified using maltose binding protein-PSF-3 covalently linked to CNBr-activated Sepharose (Pharmacia), according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs). Anti-MUS-101 and anti-PSF-3 antibodies were diluted 1:500. Secondary antibodies were Alexa Fluor 546-coupled goat anti-mouse (1:500; Invitrogen), Cy3-coupled donkey anti-rat (1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), and Alexa Fluor 488-coupled goat anti-rabbit (1:500; Invitrogen).

Quantification of DNA replication dynamics

Embryos transgenically expressing regulators of DNA replication initiation were obtained by cutting open gravid hermaphrodites using two 25-gauge needles and mounted individually on a coverslip coated with 0.1% poly-L-lysine in 10 μ L of egg buffer (Edgar, 1995). The coverslip was placed on a 3% agarose pad, and the edges were sealed with petroleum jelly. Time-lapse imaging of living embryos was performed with a camera (CoolSnap HQ2) at 1×1 binning mounted on a DeltaVision system and using a 60 \times Plan Apochromat objective. SoftWoRx software was used to acquire 49 sections of the nucleus, each separated by 0.25 μ m, with 0.15-s exposures at 100% illumination. Acquisitions were made at 30-s intervals for the strain expressing GFP::PCN-1 and 1-min intervals for the strain expressing GFP::DIV-1. Images were deconvolved and stacked using SoftWoRx software. Using ImageJ, AB and P1 nuclei were cropped from each embryo and aligned to generate a single file containing images of all nuclei. The application of thresholds (0–95%) and measurements of fluorescence distribution (quantification of nuclear area occupied by fluorescence intensity over total nuclear area) were performed on this assembled file as described previously [216], using a custom macro written for MetaMorph software (Molecular Devices). Results were analyzed using Excel (Microsoft). As S-phase length may slightly vary from one embryo to the next, time units were expressed as a percentage of the duration of nuclear GFP::PCN-1 accumulation in P1, and fluorescence intensity distributions were interpolated according to this time recalibration.

ONLINE SUPPLEMENTAL MATERIAL

Fig. S1 shows that depletion of MUS-101 does not suppress the cell fate determinant localization and actomyosin contractility defects of *par-4* mutants.

Fig. S2 provides additional information on the PCN-1-dependent DNA replication assay.

Fig. S3 shows that MUS-101 and PSF-3 are distributed symmetrically in two-cell stage *C. elegans* embryos.

Table S1 lists DNA replication initiation homologues in *C. elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, and *Homo sapiens*.

Online supplemental material is available at

<http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201312029/DC1>.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Japanese National Bioresource Project for *C. elegans* and the Caenorhabditis Genetics Center for strains and reagents. We also thank Alain Verreault, Paul Maddox, Daniel Durocher, Jonas Dorn, and members of the Maddox and Labbé laboratories for helpful discussions and comments on the manuscript, Paulina Salazar, Marianne Desrosiers, Corentin Monfort, and Julien Burger for technical assistance, and Christian Charbonneau of the Institute of Research in Immunology and Cancer (IRIC) Bio-imaging Facility for technical help with image acquisition.

C. Descoteaux held studentships from the Mach-Gaenslenn Foundation of Canada, awarded through the COPSÉ (Comité d'organisation du programme des stages d'été), and from the Faculté de médecine de l'Université de Montréal. N.T. Chartier held a fellowship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS). L. Pintard is supported by the City of Paris and by the French National Research Agency (under grant no. ANR-2012-BSV2-0001-01). This work was funded by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (no. 230043) to J.-C. Labbé, who holds the Canada Research Chair in Cell Division and Differentiation. IRIC is supported in part by the Canadian Center of Excellence in Commercialization and Research, the Canada Foundation for Innovation, and the FRQS.

The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

- Araki, H., S.H. Leem, A. Phongdara, and A. Sugino. 1995. Dpb11, which interacts with DNA polymerase II(epsilon) in *Saccharomyces cerevisiae*, has a dual role in S-phase progression and at a cell cycle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:11791–11795.
- Brauchle, M., K. Baumer, and P. Gönczy. 2003. Differential activation of the DNA replication checkpoint contributes to asynchrony of cell division in *C. elegans* embryos. *Curr. Biol.* 13:819–827.
- Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 77:71–94.
- Budirahardja, Y., and P. Gönczy. 2008. PLK-1 asymmetry contributes to asynchronous cell division of *C. elegans* embryos. *Development.* 135:1303–1313.
- Chartier, N.T., D.P. Salazar Ospina, L. Benkemoun, M. Mayer, S.W. Grill, A.S. Maddox, and J.C. Labbé. 2011. PAR-4/LKB1 mobilizes nonmuscle myosin through anillin to regulate *C. elegans* embryonic polarization and cytokinesis. *Curr. Biol.* 21:259–269.
- Diffley, J.F. 2011. Quality control in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 366:3545–3553.
- Edgar, L.G. 1995. Blastomere culture and analysis. *Methods Cell Biol.* 48:303–321.
- Edgar, L.G., and J.D. McGhee. 1988. DNA synthesis and the control of embryonic gene expression in *C. elegans*. *Cell.* 53:589–599.
- Encalada, S.E., P.R. Martin, J.B. Phillips, R. Lyczak, D.R. Hamill, K.A. Swan, and B. Bowerman. 2000. DNA replication defects delay cell division and disrupt cell polarity in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Dev. Biol.* 228:225–238.
- Essers, J., A.F. Theil, C. Baldeyron, W.A. van Cappellen, A.B. Houtsmuller, R. Kanaar, and W. Vermeulen. 2005. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol. Cell. Biol.* 25:9350–9359.
- Fievet, B.T., J. Rodriguez, S. Naganathan, C. Lee, E. Zeiser, T. Ishidate, M. Shirayama, S. Grill, and J. Ahringer. 2013. Systematic genetic interaction screens uncover cell polarity regulators and functional redundancy. *Nat. Cell Biol.* 15:103–112.
- Gaggioli, V., E. Zeiser, D. Rivers, C.R. Bradshaw, J. Ahringer, and P. Zegerman. 2014. CDK phosphorylation of SLD-2 is required for replication initiation and germline development in *C. elegans*. *J. Cell Biol.* 204:507–522.
- Gan, B., J. Hu, S. Jiang, Y. Liu, E. Sahin, L. Zhuang, E. Fletcher-Sananikone, S. Colla, Y.A. Wang, L. Chin, and R.A. Depinho. 2010. Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature.* 468:701–704.

- Goldstein, B., and I.G. Macara. 2007. The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Dev. Cell.* 13:609–622.
- Griffin, E.E., D.J. Odde, and G. Seydoux. 2011. Regulation of the MEX-5 gradient by a spatially segregated kinase/phosphatase cycle. *Cell.* 146:955–968.
- Guo, S., and K.J. Kemphues. 1995. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell.* 81:611–620.
- Gurumurthy, S., A.F. Hezel, E. Sahin, J.H. Berger, M.W. Bosenberg, and N. Bardeesy. 2008. LKB1 deficiency sensitizes mice to carcinogen-induced tumorigenesis. *Cancer Res.* 68:55–63.
- Gurumurthy, S., S.Z. Xie, B. Alagesan, J. Kim, R.Z. Yusuf, B. Saez, A. Tzatsos, F. Ozsolak, P. Milos, F. Ferrari, et al. 2010. The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. *Nature.* 468:659–663.
- Hawley, S.A., J. Boudeau, J.L. Reid, K.J. Mustard, L. Udd, T.P. Mäkelä, D.R. Alessi, and D.G. Hardie. 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* 2:28.
- Holway, A.H., C. Hung, and W.M. Michael. 2005. Systematic, RNA-interference mediated identification of *mus-101* modifier genes in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 169:1451–1460.
- Hyenne, V., M. Desrosiers, and J.C. Labbé. 2008. *C. elegans* Brat homologs regulate PAR protein-dependent polarity and asymmetric cell division. *Dev. Biol.* 321:368–378.
- Kamath, R.S., M. Martinez-Campos, P. Zipperlen, A.G. Fraser, and J. Ahringer. 2001. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* 2:H0002.
- Kemphues, K., and S. Strome. 1997. Fertilization and establishment of polarity in the embryo. In *C. elegans* II. Second edition. D.L. Riddle, T. Blumenthal, B.J. Meyer, and J.R. Priess, editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 335–359.
- Kemphues, K.J., J.R. Priess, D.G. Morton, and N.S. Cheng. 1988. Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell.* 52:311–320.
- Lizcano, J.M., O. Göransson, R. Toth, M. Deak, N.A. Morrice, J. Boudeau, S.A. Hawley, L. Udd, T.P. Mäkelä, D.G. Hardie, and D.R. Alessi. 2004. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 23:833–843.

- Maddox, P.S., N. Portier, A. Desai, and K. Oegema. 2006. Molecular analysis of mitotic chromosome condensation using a quantitative time-resolved fluorescence microscopy assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:15097–15102.
- Mäkiniemi, M., T. Hillukkala, J. Tuusa, K. Reini, M. Vaara, D. Huang, H. Pospiech, I. Majuri, T. Westerling, T.P. Mäkelä, and J.E. Syväoja. 2001. BRCT domain-containing protein TopBP1 functions in DNA replication and damage response. *J. Biol. Chem.* 276:30399–30406.
- Mantiero, D., A. Mackenzie, A. Donaldson, and P. Zegerman. 2011. Limiting replication initiation factors execute the temporal programme of origin firing in budding yeast. *EMBO J.* 30:4805–4814.
- Meister, P., A. Taddei, A. Ponti, G. Baldacci, and S.M. Gasser. 2007. Replication foci dynamics: replication patterns are modulated by S-phase checkpoint kinases in fission yeast. *EMBO J.* 26:1315–1326.
- Morton, D.G., J.M. Roos, and K.J. Kemphues. 1992. *par-4*, a gene required for cytoplasmic localization and determination of specific cell types in *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *Genetics.* 130:771–790.
- Nakada, D., T.L. Saunders, and S.J. Morrison. 2010. *Lkb1* regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature.* 468:653–658.
- Narbonne, P., V. Hyenne, S. Li, J.C. Labbé, and R. Roy. 2010. Differential requirements for STRAD in LKB1-dependent functions in *C. elegans*. *Development.* 137:661–670.
- Noatynska, A., N. Tavernier, M. Gotta, and L. Pintard. 2013. Coordinating cell polarity and cell cycle progression: what can we learn from flies and worms? *Open Biol.* 3:130083.
- Rivers, D.M., S. Moreno, M. Abraham, and J. Ahringer. 2008. PAR proteins direct asymmetry of the cell cycle regulators Polo-like kinase and Cdc25. *J. Cell Biol.* 180:877–885.
- Saka, Y., and M. Yanagida. 1993. Fission yeast *cut5+*, required for S phase onset and M phase restraint, is identical to the radiation-damage repair gene *rad4+*. *Cell.* 74:383–393.
- Sonneville, R., M. Querenet, A. Craig, A. Gartner, and J.J. Blow. 2012. The dynamics of replication licensing in live *Caenorhabditis elegans* embryos. *J. Cell Biol.* 196:233–246.
- Spilker, A.C., A. Rabilotta, C. Zbinden, J.C. Labbé, and M. Gotta. 2009. MAP kinase signaling antagonizes PAR-1 function during polarization of the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Genetics.* 183:965–977.
- Tanaka, S., R. Nakato, Y. Katou, K. Shirahige, and H. Araki. 2011. Origin association of Sld3, Sld7, and Cdc45 proteins is a key step for determination of origin-firing timing. *Curr. Biol.* 21:2055–2063.

- Waga, S., and B. Stillman. 1998. The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 67:721–751.
- Watts, J.L., D.G. Morton, J. Bestman, and K.J. Kemphues. 2000. The *C. elegans* *par-4* gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development.* 127:1467–1475.
- Woods, A., S.R. Johnstone, K. Dickerson, F.C. Leiper, L.G. Fryer, D. Neumann, U. Schlattner, T. Wallimann, M. Carlson, and D. Carling. 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.* 13:2004–2008.

FIGURES

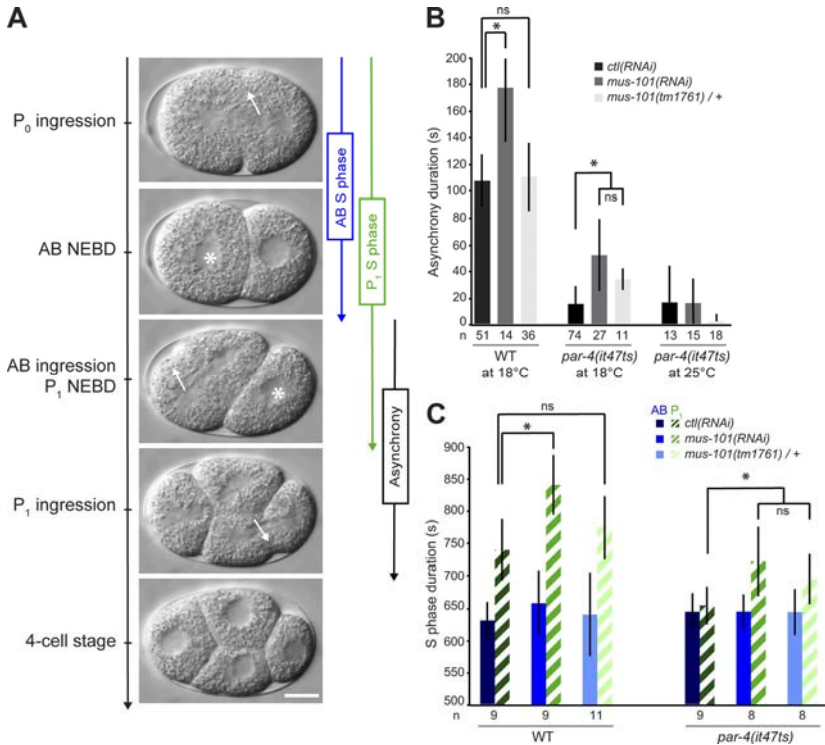


FIGURE 2.1. DEPLETION OF MUS-101 LENGTHENS THE DURATION OF ASYNCHRONOUS DIVISION AND OF P1 BLASTOMERE S PHASE IN PAR-4(IT47TS) MUTANTS.

(A) Time-lapse DIC images of a developing wild-type embryo. Asterisks denote nuclear envelope breakdown (NEBD), and arrows indicate sites of cortical ingress. Anterior is to the left. Bar, 10 μ m. (B and C) Graphs reporting (in seconds) the measurement of asynchrony duration (B) and S-phase duration of both blastomeres (C) in the specified conditions. Empty vector was used for control (ctl) RNAi. Error bars represent standard deviations, and an asterisk denotes that the value is significantly different from the ctl(RNAi) in the same genetic background ($P < 0.05$, Student's t test). The number of embryos (n) analyzed for each condition is indicated. WT, wild type.

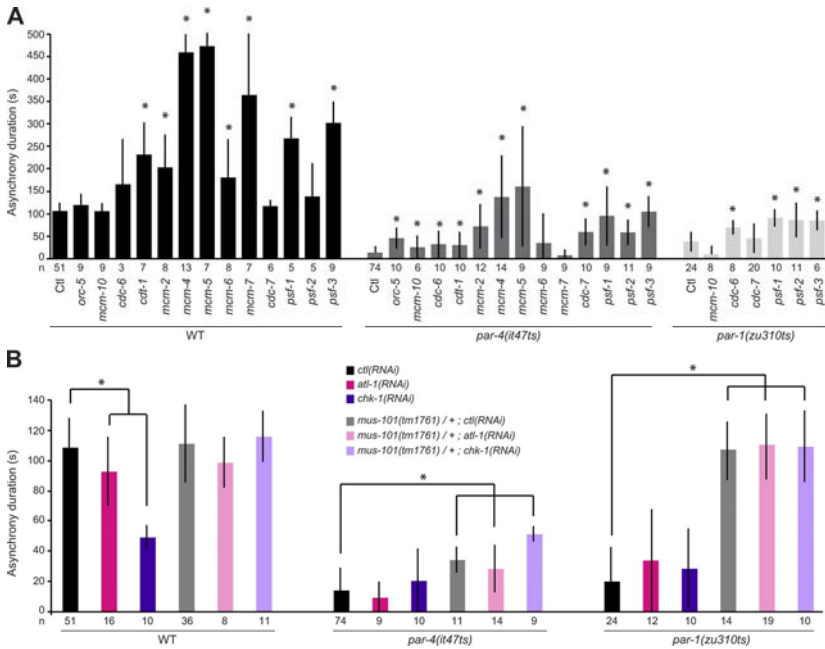


FIGURE 2.2. DEPLETING REGULATORS OF DNA REPLICATION INITIATION SUPPRESSES THE ASYNCHRONY DURATION DEFECT OF PAR-4 AND PAR-1 EMBRYOS, INDEPENDENTLY OF CHECKPOINT ACTIVITY.

(A and B) Graphs reporting the measurement of asynchrony duration (in seconds) after depletion of regulators of DNA replication initiation (A) or checkpoint regulators (B) in the specified genetic backgrounds. Measurements were made at 18°C for wild-type and *par-4(it47ts)* embryos and 22°C for *par-1(zu310ts)* embryos. Empty vector was used for control (Ctl) RNAi. Error bars represent standard deviations, and an asterisk denotes that the value is significantly different from the *ctl(RNAi)* in the same genetic background ($P < 0.05$, Student's t test). The number of embryos analyzed for each condition is indicated. WT, wild type.

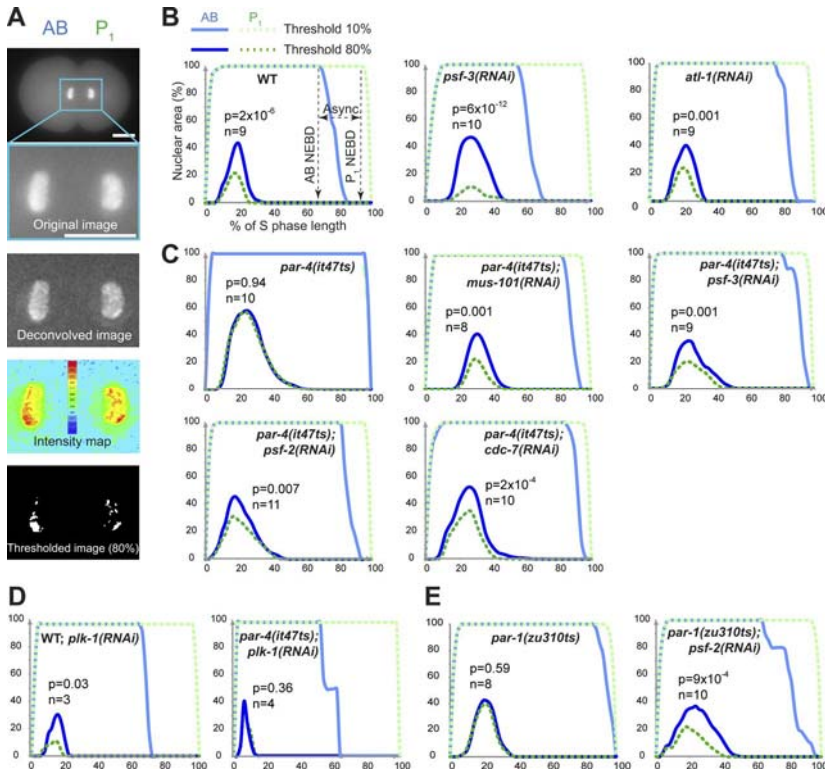


FIGURE 2.3. PAR-4 AND PAR-1 ASYMMETRICALLY REGULATE THE INITIATION OF DNA REPLICATION AT THE TWO-CELL STAGE.

(A) Fluorescence images of a *C. elegans* embryo transgenically expressing GFP::PCN-1 before (top image) and after a series of transformations that include deconvolution (second from top image), intensity measurements (second from bottom image), and threshold application (bottom image). GFP::PCN-1 nuclear distribution was measured from images after thresholds had been applied. Bars, 10 μm . (B–E) Mean percentages of AB or P1 nuclear regions occupied by GFP::PCN-1 foci after applying 10 or 80% fluorescence threshold over time during two-cell stage embryonic development. For each specified condition, analyses were made using wild-type embryos at 25°C (B), *par-4(it47ts)* embryos at 18°C (C and D), or *par-1(zu310ts)* embryos at 22°C (E). In all conditions, time is expressed in percentage of S-phase length to allow a better comparison between different embryos. For each graph, the p-value (Student’s t test) highlights the statistical difference in fluorescence distribution at the point of maximal enrichment between AB and P1 at 80% fluorescence threshold, and n corresponds to the number of embryos analyzed. WT, wild type.

TABLES

TABLE 2.I. MUTATIONS IN *MUS-101* SUPPRESS *PAR-4* LETHALITY

Genotype	18°C	20°C	25°C
	%	%	%
Wild type; <i>ctl(RNAi)</i> ¹	100 ± 0 (19)	99.9 ± 0 (4)	98.6 ± 0.4 (4)
Wild type; <i>mus-101 (RNAi)</i>	99.9 ± 0 (19)	99.9 ± 0 (4)	82.4 ± 2.1 (3)
<i>lin-11(+)</i> <i>mus-101 (tm1761)/lin-11(n389)</i> <i>mus-101 (+)</i> ; <i>ctl(RNAi)</i> ²	100 ± 0 (4)	ND	ND
<i>lin-11(+)</i> <i>mus-101 (tm1761)/lin-11(n389)</i> <i>mus-101 (+)</i> ; <i>mus-101 (RNAi)</i>	100 ± 0 (4)	ND	ND
<i>par-4(it47ts)</i> ; <i>ctl(RNAi)</i>	13.0 ± 0.8 (19)	1.0 ± 0.6 (3)	0 ± 0 (3)
<i>par-4(it47ts)</i> ; <i>mus-101 (RNAi)</i>	51.9 ± 0.8 (19) ³	19.9 ± 0.8 (3) ³	0 ± 0 (3)
<i>par-4 (it47ts)</i> ; <i>lin-11(+)</i> <i>mus-101(tm1761)/lin-11(n389)</i> <i>mus-101 (+)</i> ; <i>ctl(RNAi)</i>	33.3 ± 0.9 (3) ³	ND	ND
<i>par-4 (it47ts)</i> ; <i>lin-11(+)</i> <i>mus-101(tm1761)/lin-11(n389)</i> <i>mus-101 (+)</i> ; <i>mus-101 (RNAi)</i>	74.5 ± 4.5 (3) ³	ND	0 ± 0 (3)

The values correspond to the mean percentage of hatching embryos over the total number of embryos ± SEM. The numbers in parentheses correspond to the number of triplicate assays performed. N.D., not determined.

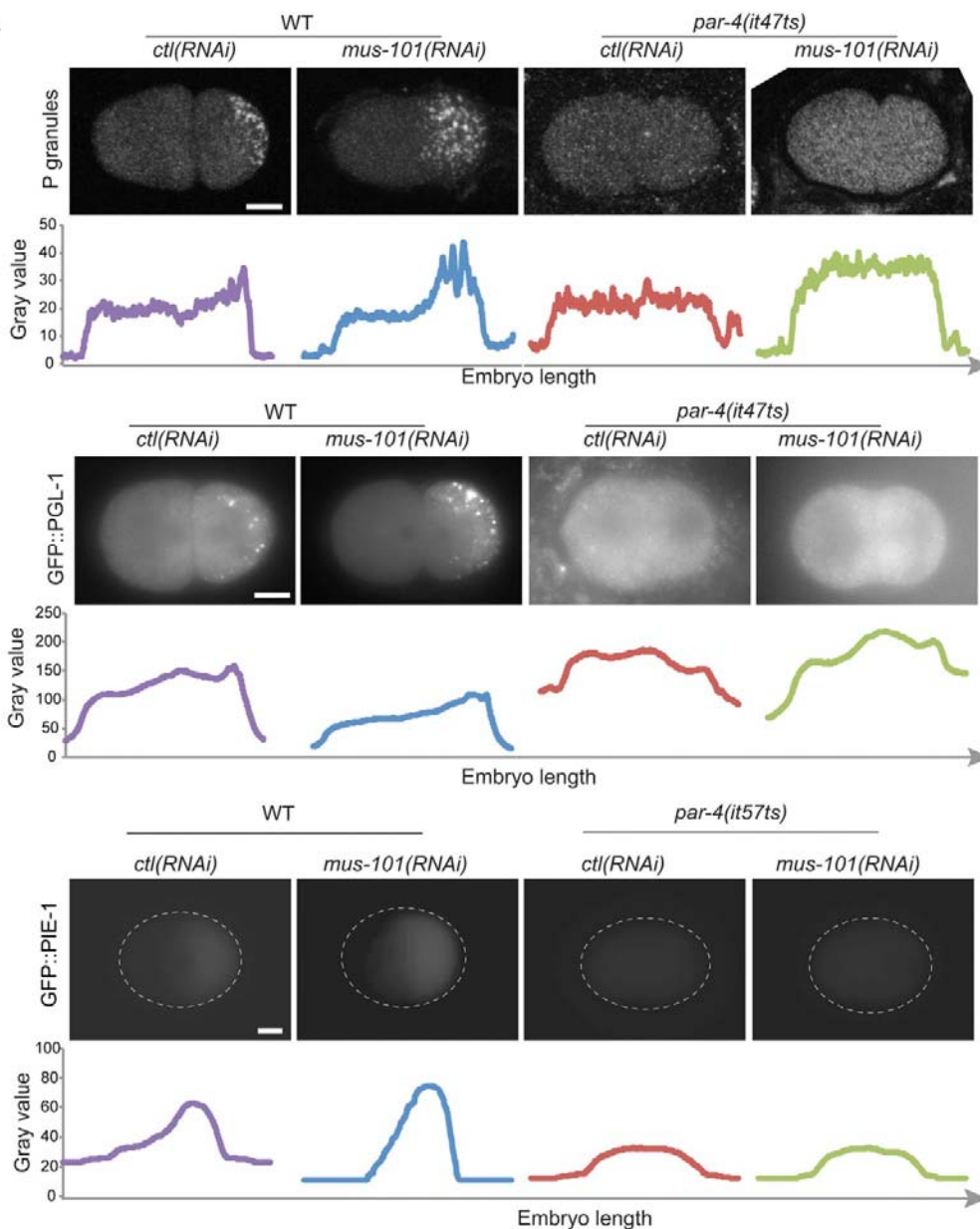
¹Empty vector was used for RNAi control.

²The gene *lin-11* is positioned very close to the *mus-101* gene on chromosome I, and heterozygote animals give rise to sterile adults (*mus-101 (tm1761)* homozygotes), vulvaless adults (*lin-11(n389)* homozygotes), and viable, fertile heterozygotes.

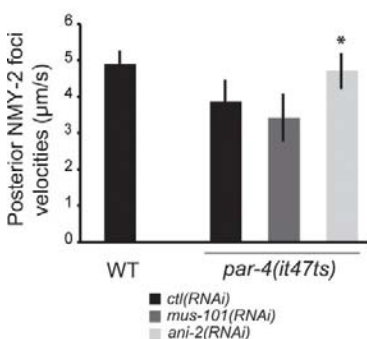
³The value is significantly different from the *par-4* control at the same temperature (P < 0.05, Student's t test)

SUPPLEMENTAL FIGURES

A



B



C

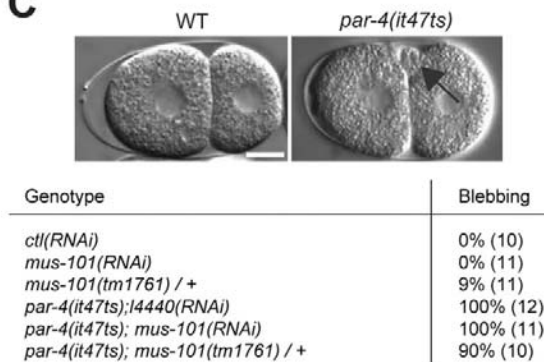


FIGURE 2.S1. DEPLETION OF MUS-101 DOES NOT SUPPRESS THE CELL FATE DETERMINANT LOCALIZATION AND ACTOMYOSIN CONTRACTILITY DEFECTS OF PAR-4 MUTANTS.

(A) *C. elegans* two-cell stage embryos fixed and stained with anti-P granules antibodies (top) or live two-cell stage embryos expressing GFP::PGL-1 (middle) or GFP::PIE-1 (bottom) in the specified conditions. The graphs display measurements of fluorescence intensities along the long axis of the embryo. In the bottom panels, the dotted line denotes the approximate edge of the embryo. Depletion of MUS-101 had no effect on the mislocalization of these markers in *par-4* mutants. (B) Mean velocities (in micrometers/second) of NMY-2 foci moving toward the anterior of wild-type or *par-4* mutant embryos. Error bars represent standard deviations, and an asterisk denotes statistical significance when compared with the wild type ($P < 0.05$, Student's t test). As opposed to depletion of ANI-2, a positive control that was previously shown to restore actomyosin contractility in *par-4* mutants, depletion of MUS-101 did not increase cortical NMY-2 foci velocity in *par-4* mutants. (C) DIC images of wild-type and *par-4* mutant embryos undergoing first cytokinesis. The arrow points to a site of cortical blebbing, a phenomenon whose occurrence is reported in the table below (with the number of embryos denoted in parentheses). Depletion of MUS-101 did not suppress the cortical blebbing defect of *par-4* mutants. In all images, anterior is to the left. Bars, 10 μm . WT, wild type.

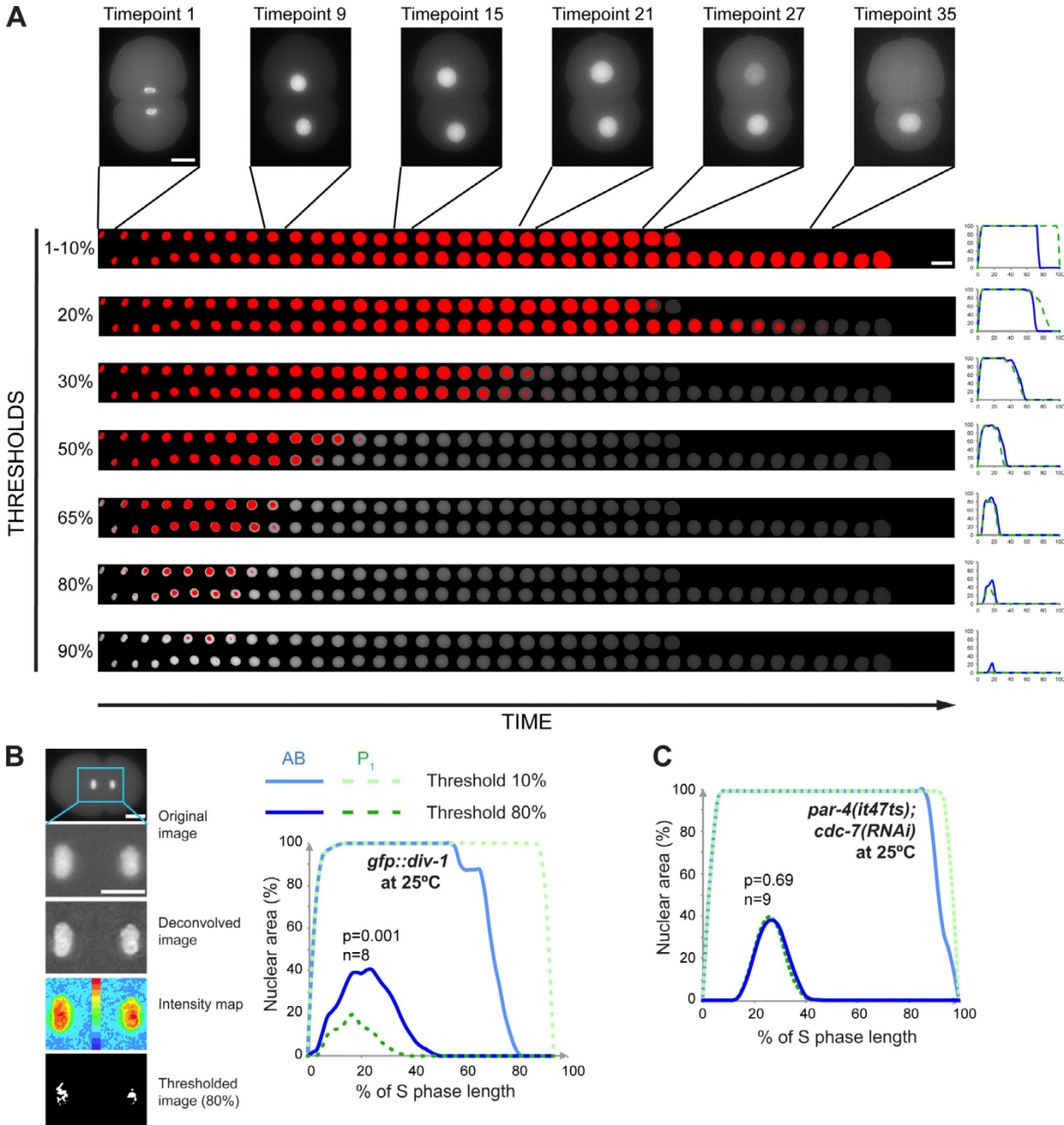


FIGURE 2.S2. PAR-4 REGULATES THE INITIATION OF DNA REPLICATION.

(A) Time-lapse images of a wild-type embryo expressing GFP::PCN-1 (top) from which nuclei were cropped and assembled in a single image file for analysis. Bottom images show assembled files after application of various fluorescence intensity thresholds (1–90%). Total GFP::PCN-1 fluorescence pixels are shown in gray levels, and pixels higher than the specified threshold are represented in red. Graphs on the right represent mean percentages of AB (blue lines) or P1 (green lines) nuclear regions occupied by GFP::PCN-1 foci after applying the specified threshold over time

during two-cell stage embryonic development. (B) Fluorescence images of a *C. elegans* embryo transgenically expressing GFP::DIV-1 before (top image) and after a series of transformations that include deconvolution (second from top image), intensity measurements (second from bottom image), and threshold application (bottom image). GFP::PCN-1 nuclear distribution was measured from images after thresholds had been applied. Mean percentages of AB or P1 nuclear regions occupied by GFP::PCN-1 foci after applying 10 or 80% fluorescence threshold over time during two-cell stage embryonic development at 25°C. As is the case for GFP::PCN-1, GFP::DIV-1 distribution is higher in AB than in P1. Anterior is to the left. (C) Mean percentages of AB (continuous lines) or P1 (dotted lines) nuclear regions occupied by GFP::PCN-1 foci after applying 10% (light color) or 80% (dark color) fluorescence threshold over time during two-cell stage embryonic development of *par-4(it47ts); cdc-7(RNAi)* embryos grown at 25°C. Depleting CDC-7 at fully restrictive temperature does not restore asymmetry in the distribution of nuclear GFP::PCN-1 at high fluorescence thresholds. In panels B and C, time is expressed in percentage of S-phase length to allow a better comparison between different embryos. For each graph, the p-value (Student's t test) highlights the statistical difference in fluorescence distribution at the point of maximal enrichment between AB and P1 at 80% fluorescence threshold, and n corresponds to the number of embryos analyzed. Bars, 10 μ m.

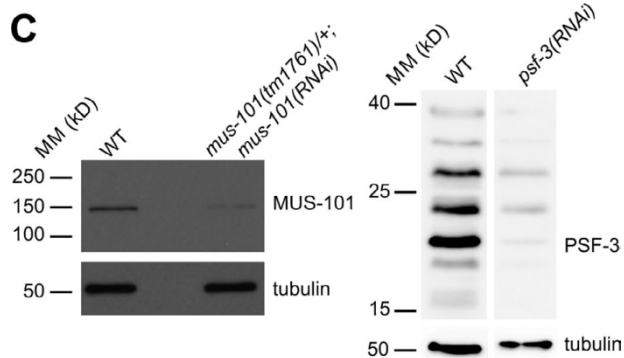
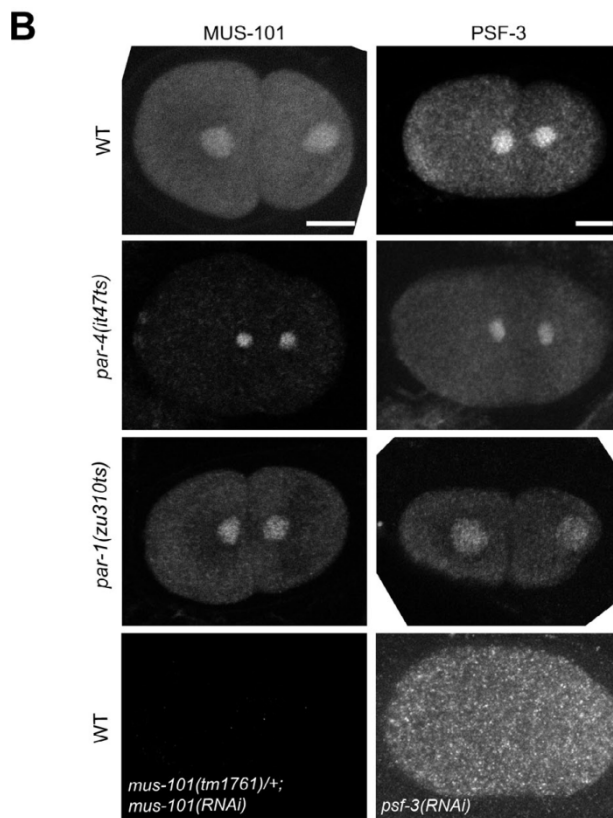
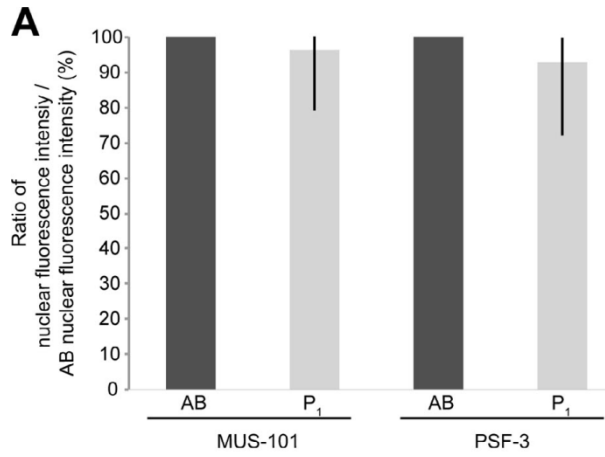


FIGURE 2.S3. MUS-101 AND PSF-3 ARE DISTRIBUTED SYMMETRICALLY IN TWO-CELL STAGE EMBRYOS.

(A) Quantification of fluorescence intensities measured in the nuclei of fixed two-cell stage wild-type embryos stained for MUS-101 and PSF-3 antibodies. S-phase progression was assessed by DAPI staining. Measurements are expressed as total nuclear intensity in the indicated nucleus over total nuclear intensity measured in the AB nucleus. No statistical difference was observed in the distribution of either protein. Error bars denote standard deviation. (B) Wild-type, *par-4(it47ts)*, and *par-1(zu310ts)* two-cell stage embryos grown at 25°C, fixed, and stained for MUS-101 (left row) or PSF-3 (right row). Bars, 10 μm. Bottom images depict embryos depleted in either MUS-101 (left) or PSF-3 (right). (C) Western blot analysis of extracts from animals stained for MUS-101 (top left) or PSF-3 (top right). (bottom) Tubulin was used as a loading control. MM, molecular mass; WT, wild type.

SUPPLEMENTAL TABLES

TABLE 2.SI. DNA REPLICATION INITIATION HOMOLOGUES IN VARIOUS SPECIES

Sequence designation	Gene name				Reference
	<i>C. elegans</i> ^a	<i>S. cerevisiae</i> ^b	<i>D. melanogaster</i> ^c	<i>H. sapiens</i> ^d	
Y39A1A.12	<i>orc-1</i>	<i>ORC1</i>	<i>Orc1</i>	<i>ORC1</i>	Sonneville et al., 2012
F59E10.1	<i>orc-2</i>	<i>ORC2</i>	<i>Orc2</i>	<i>ORC2</i>	Sonneville et al., 2012
ZC168.3	<i>orc-5</i>	<i>ORC5</i>	<i>Orc5</i>	<i>ORC5</i>	Sonneville et al., 2012
Y17G7B.5	<i>mcm-2</i>	<i>MCM2</i>	<i>Mcm2</i>	<i>MCM2</i>	Sonneville et al., 2012
C25D7.6	<i>mcm-3</i>	<i>MCM3</i>	<i>Mcm3</i>	<i>MCM3</i>	Sonneville et al., 2012
Y39G10AR.14	<i>mcm-4</i>	<i>MCM4</i>	<i>dpa</i>	<i>MCM4</i>	Korzelius et al., 2011; Sonneville et al., 2012
R10E4.4	<i>mcm-5</i>	<i>MCM5</i>	<i>Mcm5</i>	<i>MCM5</i>	Sonneville et al., 2012
ZK632.1	<i>mcm-6</i>	<i>MCM6</i>	<i>Mcm6</i>	<i>MCM6</i>	Sonneville et al., 2012
F32D1.10	<i>mcm-7</i>	<i>MCM7</i>	<i>Mcm7</i>	<i>MCM7</i>	Sonneville et al., 2012
Y47D3A.28	<i>mcm-10</i>	<i>MCM10</i>	<i>Mcm10</i>	<i>MCM10</i>	This study
Y54E10A.15	<i>cdt-1</i>	<i>TAH11</i>	<i>dup</i>	<i>CDT1</i>	Zhong et al., 2003
C43E11.10	<i>cdc-6</i>	<i>CDC6</i>	<i>Cdc6</i>	<i>CDC6</i>	Kim et al., 2007
C34G6.5	<i>cdc-7</i>	<i>CDC7</i>	<i>I(1)G0148 and CG5790</i>	<i>CDC7</i>	Manning, 2005
F34D10.2	<i>evl-18 and cdc-45</i>	<i>CDC45</i>	<i>CDC45L</i>	<i>CDC45</i>	Korzelius et al., 2011; Sonneville et al., 2012
T12F5.1	<i>sld-2</i>	<i>SLD2</i>	<i>RecQ4</i>	<i>RECQL4</i>	Gaggioli et al., 2014
F37D6.1	<i>mus-101</i>	<i>DPB11</i>	<i>mus101</i>	<i>TOPBP1</i>	Holway et al., 2005
R53.6	<i>psf-1</i>	<i>PSF1</i>	<i>Psf1</i>	<i>GINS1</i>	Franz et al., 2011; this study
F31C3.5	<i>psf-2</i>	<i>PSF2</i>	<i>Psf2</i>	<i>GINS2</i>	Franz et al., 2011; this study
Y65B4BR.8	<i>psf-3</i>	<i>PSF3</i>	<i>Psf3</i>	<i>GINS3</i>	Franz et al., 2011; this study
Y113G7B.24	<i>sld-5</i>	<i>SLD5</i>	<i>Sld5</i>	<i>GINS4</i>	Franz et al., 2011; Sonneville et al., 2012
R01H10.1	<i>div-1</i>	<i>POL12</i>	<i>DNAPol-α73</i>	<i>POLA2</i>	Encalada et al., 2000
W03D2.4	<i>pcn-1</i>	<i>POL30</i>	<i>mus209</i>	<i>PCNA</i>	Brauchle et al., 2003

^aWormBase nomenclature.

^bSaccharomyces Genome Database nomenclature.

^cFlyBase nomenclature.

^dHUGO Gene Nomenclature Committee

CHAPITRE 3

ARTICLE 2: AN RNAI SCREEN FOR SUPPRESSORS OF *PAR-4* EMBRYONIC LETHALITY IN *C. ELEGANS* UNCOVERS NEW POTENTIAL REGULATORS OF POLARITY ESTABLISHMENT

Le manuscrit présente mes résultats portant sur *par-4* et son rôle dans la polarité. Il sera soumis au journal *Developmental Biology* sous peu.

Le criblage a été effectué par Diana Paulina Salazar Ospina et Dr Nicolas Chartier. Corentin Monfort et Dr Laura Benkemoun ont contribué à certaines analyses phénotypiques et aux idées. Catherine Descoteaux a participé à l'analyse phénotypique des suppresseurs de létalité, aux idées, ainsi qu'à la rédaction de l'article.

An RNAi screen for suppressors of *par-4* embryonic lethality in *C. elegans* uncovers new potential regulators of polarity establishment

Catherine Descoteaux¹, Nicolas Chartier¹, Laura Benkemoun¹, Diana Paulina Salazar Ospina¹, Corentin Monfort¹, Jean-Claude Labbé^{1,2}

¹Cell Division and Differentiation Laboratory, Institute of Research in Immunology and Cancer, and

²Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada

Number of characters: 16,370

ABSTRACT

In *Caenorhabditis elegans*, the highly conserved serine/threonine kinase PAR-4 regulates early polarization and asymmetric cell division in the embryo. A mutation in the gene *par-4* disrupts embryonic polarity by perturbing three main cellular processes: asymmetric segregation of cell fate determinants, asynchronous regulation of cell cycle progression, and contractility of the actomyosin network. In order to identify regulators of the PAR-4-dependant pathways, we performed a screen for suppressors of the embryonic lethality associated with a mutation in *par-4*, and identified 6 genes. Most of these genes encode proteins not previously shown to be involved in cell polarization and have conserved homologs with defined activities including protein phosphorylation, ubiquitination, proteolysis and scaffolding. Using quantitative imaging of specific PAR-4-dependent cellular events, we aimed to determine which of these are controlled by each suppressor during early *C. elegans* embryonic development. Molecular analysis of these suppressors reveals details on the mechanism through which PAR-4 regulates cell polarization and promotes asymmetric cell division.

Keywords (10):

- *par-4*/LKB1
- *par-1*/MARK
- asymmetric cell division
- actomyosin contractility
- cell cycle
- cell fate determinants segregation
- Peutz-Jeghers syndrome
- embryonic polarity
- quantitative imaging
- *C. elegans*

INTRODUCTION

The proper establishment and the maintenance of cell polarity are essential to most of the cells. In *C. elegans*, embryonic polarity is established following the fertilization of the oocyte by the sperm, in what will become the posterior pole of the 1-cell embryo (called P₀) [26, 27]. A sperm nucleus-associated, centrosome-dependent signal locally triggers a relaxation of actomyosin contractility that leads to a cortical rearrangement and displacement of the cortical cytoskeleton toward the opposite pole of the embryo. To compensate for this cortical movement, the central cytoplasm flows toward the other, non-contractile embryonic pole, which will form the posterior [30, 32]. These movements promote the asymmetric localization of PAR proteins, which are conserved cortical regulators of cell polarity, as well as cytoplasmic cell fate determinants along the antero-posterior axis of the embryo. Upon mitotic entry, PAR proteins promote the antero-posterior orientation and posterior displacement of the mitotic spindle, resulting in an asymmetric division and formation of a large anterior blastomere, called AB, and a small posterior blastomere, called P1. The division of both blastomeres at the 2-cell stage is asynchronous, with AB dividing ~2 min before P1. Mutations in the genes encoding PAR proteins result in defects that include a loss of embryonic polarity, segregation of cell fate determinants, spindle positioning, asymmetric cell division and asynchronous cell cycle timing at the 2-cell stage, the sum of which is lethal to the embryo [81].

One of the PAR proteins, PAR-4 is a serine/threonine kinase and orthologue of the tumor suppressor LKB1 (also known as STK11) [82]. Human LKB1 was previously shown to exert its regulation on cell growth and cell polarity in part by phosphorylating several kinases of the AMPK sub-family, including AMPK itself and MARKs [86, 87]. *C. elegans* PAR-4 can likewise phosphorylate AMPK subunits and the MARK orthologue PAR-1 [64, 114]. Loss of *par-4* results in polarity and asymmetric cell division defects that include mis-segregation of cell fate determinants, decreased cortical actomyosin contractility and PAR protein asymmetric distribution, synchronous cell cycle timing at the 2-cell stage and embryonic lethality [32, 81, 89, 101, 204]. Embryos mutant for *par-1* display some but not all of these defects, which supports the notion that PAR-4 controls cell polarity and asymmetric division in part through PAR-1. The effectors of PAR-4 for the control of these cellular processes are largely unknown.

In order to investigate the role of *par-4* in *C. elegans* embryonic polarity and asymmetric division, we performed an RNAi-based screen to find suppressors of the embryonic lethality resulting from the loss of *par-4* function. The screen uncovered 7 suppressors that we

characterized for their regulations of PAR-4-dependent cellular activities, allowing us to further define how PAR-4 controls cell polarity and asymmetric cell division. Some of these genes acted on cell polarity through PAR-1, further supporting the functional relationship between the two kinases. Our work thus refines our understanding of PAR-4/LKB1 signalling in animal cells.

MATERIAL AND METHODS

Strains

C. elegans strains were grown on *E. coli* OP50-seeded nematode growth medium (NGM) plates as described previously [225]. All strains were maintained at 15°C and assayed at various temperatures, as indicated. The strains and alleles used in this study are listed in Table 3.1.

RNA interference (RNAi) assays and suppressor screen

The screen for suppressors of *par-4(it57)* lethality was performed by growing animals in 96-well plates in liquid NGM medium at 18°C as described previously [99]. Each RNAi clone of the Ahringer library [139] was assayed in triplicate and suppression was assessed by qualitative analysis. Subsequent confirmation and quantitative analysis of positive hits were done on solid NGM medium by feeding animals as described previously [141, 144, 145], using clones from the Ahringer library. Animals were grown on OP50 bacteria until they reached the L4 stage, when they were transferred to RNAi plates and incubated during 24-48h at the appropriate assay temperature.

Image acquisition and quantitative image analysis

Hermaphrodite adult worms were cut using two 25 gauge needles. Their embryos were collected in 10 μ L of egg buffer on a coverslip covered with 0,1% poly-L-lysine. The coverslip was then placed on a slide with a patch of 3% agarose and clay on each corner, and the edges were sealed with petroleum jelly.

To measure cortical actomyosin velocities, embryos expressing *nmy-2::gfp* (myosin) were collected right after fertilization and observed with a microscope Nikon Sweptfield Confocal with a 100X lens, at intervals of 10 seconds, and for a stack of 17 slices separated by 0,5 μ m, located at the cortex. The images obtained were transformed into kymographs using the *Multiple kymograph* function of the ImageJ software [226]. For every embryo, 3 kymographs were traced and 4 actomyosin patches were quantified per kymograph, for a total of 12 independent measurements per embryo. To obtain a velocity value in μ m/s, we need to multiply the distance by 0,13 μ m/pixel and the time by 10s/pixel. To consider the variability between every embryo, we calculate the standard deviation of the means, for which every embryo is considered as an independent system.

To measure the cell cycle timing asynchrony between AB and P1 divisions, embryos were mounted as above and mid-plane sections were acquired with a microscope Zeiss AXIO Imager with a 63X lens, at intervals of 5 seconds. The cell cycle asynchrony was defined as the difference

in time between cytokinetic ingression in the AB cell and that of the P1 cell, as assessed by visual inspection of cortical deformation following anaphase.

To measure cell fate determinant asymmetric localization, embryos expressing *gfp::pie-1* were collected right after fertilization and DIC and epifluorescence images were collected using the microscope Zeiss AXIO Imager, at intervals of 10 seconds. Maximal fluorescence intensity was measured along a 30 pixel-wide line drawn along the antero-posterior axis of 2-cell stage embryos expressed as a fraction of maximal intensity along embryo length. The percent intensities were interpolated using the function *Interpolate* in Excel. The ratio of fluorescence intensity calculated between each half of the embryo was used to assess asymmetric distribution of the marker.

Lethality assays

An empty L4440 vector is used as a negative control, because it doesn't have any lethal effect on the embryo. Worms were deposited on plates containing HT115 bacteria expressing RNAi (See RNA interference (RNAi) inactivation). Unless otherwise stated, we used worms expressing the *par-4(it57)* allele at the semi-permissive temperature 18°C. The worms were incubated for 48h at 18°C to lay eggs, and then the adults were killed. After another 48h of incubation at 18°C, we evaluated the lethality by counting the number of eggs that hatched. At 18°C, the strain *par-4(it57)* expresses a mutant phenotype. If the RNAi doesn't have an effect on the embryo, the eggs won't hatch. However, if the inactivation suppresses lethality, some eggs will hatch. Every test was achieved thrice. For every condition, we calculated the mean of viability ratio and the standard deviation.

Phylogenetic tree

We first collected the sequences of all the PCs from *Saccharomyces cerevisiae*, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Hydra vulgaris*, *Dario rerio*, *Xaenopus laevis*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* and *Homo sapiens*. We also included the sequence of the subtilisin from the prokaryote *Bacillus subtilis* to maximise the distance between sequences. The sequences were then aligned using the M-Coffee method in T-Coffee [227, 228]. The M-Coffee method allows using multiple alignments methods at once, so we used ClustalW2, Muscle and Mafft, which are all suitable for medium alignments. The result of the alignment let us suppress some divergent sequences from our data. We then re-aligned the remaining sequences with M-Coffee, using ClustalW2, Muscle and Mafft. The alignment was then evaluated in T-coffee, to remove the empty columns and to optimize the alignment.

Using ProtTest 3, we determined that the best evolution model was LG, an advanced version of the aminoacid replacement matrix WAG [229-231]. These evolutive models are used to calculate the likelihood of the phylogeny of a set of proteins, based on their sequences. Using this information, we built a phylogenetic tree by doing a 1000 bootstraps analysis in PhyML 3.0 [232]. Finally, the tree was visualised using FigTree, a license-free software that allows graphic enhancement of phylogenetic trees (available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

RESULTS AND DISCUSSION

A screen for suppressors of *par-4(it57ts)* embryonic lethality uncovers 7 genes.

We first used a genetic approach to identify genes that function with *par-4* to regulate cell polarity and asymmetric division. As both processes are essential for embryonic viability in *C. elegans*, we set out to screen for genes whose depletion restores embryonic viability in the progeny of otherwise lethal *par-4* mutant mothers. We chose the *par-4(it57ts)* allele as it had been previously characterized as a strong, conditional loss-of-function allele for the gene, allowing for a wide window of embryonic viability [89]. Analysis of temperature sensitivity for this allele revealed that 60% of embryos produced by *par-4* mutant mothers (hereafter referred to as *par-4* mutant embryos) hatched at 17°C, but that hatching frequency decreased to 5% at 18°C (Figure 3.1A). This latter temperature was thus chosen to conduct the suppressor screen.

The screen was performed by systematic RNAi depletion of *C. elegans* ORFs, as described previously [99]. The first analysis revealed 981 genes whose depletion by RNAi qualitatively restored embryonic viability in *par-4* mutants. Quantitative analysis of embryonic viability on solid medium for these genes indicated that the depletion of 25 of these could restore embryonic viability in *par-4* mutants. We subsequently tested these genes in parallel in multiple quantitative assays for embryonic viability (Figure 3.1C), which revealed that depletion of 6 genes consistently and significantly restored embryonic viability in *par-4* mutants (Figure 3.1B). We thus consider these genes as *bona fide* suppressors of *par-4* lethality.

The genes that we uncovered fall into various functional categories (Figure 3.1C). *mus-101* encodes the orthologue of the human topoisomerase II binding protein 1 (TopBP1) and we previously showed that it acts with both *par-4* and *par-1* to regulate the S-phase progression in the P1 blastomere, through its role in DNA replication [204]. We also previously showed that *ani-2*, which encodes a short-isoform homologue of the human actomyosin scaffold protein anillin, regulates the function of *par-4* in cortical contractility by competing with the canonical anillin protein ANI-1 [101]. *fkf-6* codes for a homologue of the human peptidyl-prolyl cis-trans isomerase HSP56, which typically functions as an immunophilin to regulate T-cell activation [155, 233]. *aex-5* (anterior body contraction and expulsion deficient) encodes a Kex2-subtilisin-like proprotein convertase involved in the motoneuronal program of *C. elegans* defecation [160]. *ubr-1* codes for an ortholog of the human E3 ubiquitin-ligase UBR2, which recognizes destabilizing N-terminal residues of short-lived proteins [234]. Finally, *rskn-1* encodes the orthologue of the human serine-threonine kinase RSK1. As RSK1 is a substrate of the MAP kinases ERK1/2 in humans, we

hypothesized that the depletion of the orthologue of ERK1/2, MPK-1, could also suppress embryonic lethality in *par-4* mutants. Indeed, we found that when we depleted *mpk-1* in *par-4* mutants, we restored embryonic viability to $57,4 \pm 20\%$, a value significantly higher than control ($1,0 \pm 0,4\%$) (Figure 3.1B).

The lethality suppressors act in the three *par-4*-dependent pathways in the embryo

While the effect of MUS-101 and ANI-2 on PAR-4-dependent activities has been studied in details, little is known on the functional links between PAR-4 and the 5 other suppressors of lethality. In order to better understand the role of these 5 suppressors in the *C. elegans* PAR-4 pathway, we sought to characterize what is the consequence of their depletion on PAR-4-dependent cellular activities. When *par-4* is depleted, three main embryonic processes are disturbed: the anterior-directed flow of cortical actomyosin, the segregation of cell fate determinants, and the cell cycle asynchrony between AB and P1. We asked whether these five lethality suppressors act with *par-4* in these biological processes.

First, we tracked the velocity of the fusion protein NMY-2::GFP at the cortex of the embryo during the polarization phase, as described previously [101] (Figure 3.2A). Using the thermosensitive allele *par-4(it57)*, we worked at 25°C, because at that temperature, the *par-4* loss-of-function phenotype of slow NMY-2::GFP migration is strong and can be efficiently suppressed by depletion of *ani-2* [101]. In control embryos, NMY-2::GFP migrates at 5.2 µm/min, and this velocity is reduced to 4,0 µm/min in *par-4* mutants [32, 101](Figure 3.2B). Depletion of the five uncharacterized lethality suppressors in *par-4* mutants resulted in a significant increase in the velocity of actomyosin foci, compared to control, with speeds of 4.3-5.3 µm/min. Interestingly, the depletion of *fkf-6* in control embryos increased the velocity to 5.7 µm/min, suggesting that *fkf-6* regulates actomyosin contractility independently of *par-4*. It has been previously shown that the depletion of *fkf-6* suppresses the embryonic lethality of *let-502* mutants [159]. LET-502 is a Rho-binding S/T kinase that regulates actomyosin contractility, raising the possibility that FKF-6 regulates contractility through negative regulation of this pathway. We did not observe any effect on NMY-2::GFP velocity when we depleted any of the four other lethality suppressors in control embryos. Our results therefore suggest that *ubr-1*, *mpk-1*, *rskn-1* and *aex-5* regulate actomyosin contractility in a PAR-4-dependent manner, while *fkf-6* exerts its effect on contractility through the Rho pathway.

par-4 regulates the proper localization of the cell fate determinants such as PIE-1 and P granules in the posterior pole of the embryo. In order to find which lethality suppressors are involved in this activity, we looked for those that restored an asymmetry of PIE-1::GFP localization when depleted in *par-4* mutants. We performed this analysis at 20°C, because this temperature was the lowest at which we could observe a significant loss of PIE-1::GFP asymmetry. Using live imaging, we measured the average intensity of fluorescence in the two halves of the embryo after

the first cell division and calculated the ratio of the intensity of fluorescence in the anterior pole over the intensity in the posterior pole, as described previously (Figure 3A)[101]. We found that control embryos had a ratio of 0,40 and this ratio was 0.84 in *par-4* mutants, consistent with PIE-1 being enriched at the posterior of control embryos but symmetric in *par-4* mutants. We found that depletion of *mpk-1* and *rskn-1* in *par-4* mutants reduced the ratio in each case to 0,75 consistent with PIE-1::GFP localizing more posteriorly in these conditions (Figure 3.3B-E). This mild but significant decrease suggests that *mpk-1* and *rskn-1* function with *par-4* to regulate the segregation of the cell fate determinant PIE-1. Neither gene depletion had an effect in control embryos and none of the other suppressors restored posterior localization of PIE-1::GFP in any condition, indicating that only MPK-1 and RSKN-1 function in this pathway among the suppressors identified in the screen.

Finally, *par-4* controls cell cycle timing at the 2-cell stage, as a loss of *par-4* leads to a synchronous division between AB and P1 blastomeres [81]. In order to test if our lethality suppressors act in this pathway, we measured the difference in time between the initiation of cytokinetic ingression of the two blastomeres (Figure 3.4A). We previously found that depletion of *mus-101* in *par-4* mutants increases the synchrony between AB and P1 by specifically accelerating DNA replication dynamics in P1 [204]. We used the allele *it47* because all the experiments we previously made on cell cycle in the embryo were done using that allele. We worked at 18°C so that we could see a synchrony between AB and P1 but without having a phenotype too strong that could not be suppressed. In the WT control, we found a delay of asynchrony of 111 seconds. In the control in the *par-4* mutant, the asynchrony was reduced to 12 seconds. The positive control *mus-101* shows an increase in asynchrony to 141 seconds in the WT strain and 55 seconds in the *par-4* mutant. When we depleted *mpk-1* and *rskn-1* in *par-4* mutants, the asynchrony between AB and P1 was increased to 38 and 34 seconds, respectively (Figure 3.4B). The asynchrony was not affected when we depleted *mpk-1* or *rskn-1* in WT embryos. Interestingly, we couldn't see any significant effect on asynchrony using the RNAi for the other lethality suppressors, as well as using the mutant alleles *aex-5(sa23)* and *unc-51(e369)/qls56 fkb-6(tm2614)* crossed with *par-4(it57)* (Figure S1A-B). In our previous work, we didn't see any effect on asynchrony by inactivating genetically *ani-2* [101]. This suggests that asynchrony may not be a pathway essential for embryonic viability, but that it may instead be a consequence of it. This supports the model proposed by Brauchle et al in 2003 [65]. Taken together, our results suggest that *mpk-1* and *rskn-1* interact genetically with *par-4* to regulate the cell cycle timing, but that this pathway might not be important for embryonic development.

***mpk-1* and *rskn-1* (RNAi) suppress partially the *par-1* phenotypes of PIE-1::GFP mislocalization and synchrony**

PAR-1 is a serine-threonine kinase that acts downstream of PAR-4 in a number of organisms and the depletion of *par-1* leads to a phenotype similar to what is observed in *par-4* mutants for cell cycle asynchrony and cell fate determinants segregation [81, 87, 104, 207]. We found that MPK-1 and RSKN-1 function with PAR-4 in these processes and MPK-1 was previously reported to antagonize PAR-1 activity in the early embryo [150]. We therefore asked whether the depletion of *mpk-1* and *rskn-1* would also restore proper asymmetries and cell cycle timing in *par-1(zu310)* mutants. To this end, we first measured the distribution of PIE-1::GFP in *par-1* mutant embryos grown at 24°C, because the defect in cell fate determinant localization was readily visible at this temperature. We found that the loss of *par-1* function led to a ratio of fluorescence intensities of 0,89, similar to that measured in *par-4* mutants (Figure 3.5C). Depletion of *mpk-1* and *rskn-1* resulted in ratios of 0,64 and 0,80, respectively, which are slightly but significantly different than control (Figure 3.5A-C). These results indicate that both genes act as suppressors of *par-1* in the cell fate specification pathway.

We measured cell cycle asynchrony in *par-1* mutant embryos at 22°C, because that was the lowest temperature at which we could see *par-1*-associated defects. We found that *par-1* mutant embryos showed an asynchrony of 15 seconds, which is different than the 115 seconds measured in control embryos and similar to the phenotype of *par-4* mutants. Depletion of *mpk-1* and *rskn-1* showed an asynchrony of 48 and 52 seconds, respectively, which is significantly higher than *par-1* mutants but still short of WT embryos. These results indicate that *mpk-1* and *rskn-1* function with *par-1* to regulate cell cycle asynchrony.

Taken together, these results indicate that depletion of either *rskn-1* or *mpk-1* can partially restore cell fate determinant segregation and cell cycle asynchrony in both *par-4* and *par-1* mutant embryos. As depletion of *rskn-1* or *mpk-1* also partly restores a high velocity of cortical actomyosin flows in *par-4* mutants, a process that is independent of *par-1*, this suggests that the two genes act upstream in the signalling pathway, perhaps at or near the level of PAR-4 itself.

AEX-5 functions in embryonic development independently of its activity in the intestine

Our screen uncovered *aex-5* as a suppressor of *par-4*-mediated cortical flows defect and embryonic lethality. While *aex-5* encodes a secreted proprotein convertase (PC), all published evidence supports a model in which cell polarity and PAR-4 activity in the embryo are cell autonomous. Characterizing the role of AEX-5 in the embryo could potentially uncover a new mechanism of regulation for embryonic polarity or asymmetric cell division.

PCs are proteases that typically cleave peptidic precursors to activate them. In mammals, nine PCs with diverse cellular functions have been identified and characterized [182]. It is not clear which PCs show the highest sequence similarity with AEX-5, as previous investigators have proposed that AEX-5 is closer to PC7 and yeast KEX2 [187], while others have suggested that it is closer to furins [188] or PC1, PC3 and PC7 [168]. In order to find which PCs are evolutionary closer to AEX-5, we decided to compare its sequence with the PCs of a variety of model organisms and to construct a phylogenetic tree, using a 1000-bootstrap analysis (Figure 3.S2). We found that the AEX-5 sequence is more closely related to *S. cerevisiae* KEX2, to mammalian PC7, and to a lesser extent, to *S. cerevisiae* Rrt12p, PRB1, and YSP3. These results are similar to what was suggested by Thacker and Rose [187], and go along the idea of PC7 being the most ancient PC [235].

aex-5 belongs to a phenotypic class of genes comprising 5 other genes that have different activities but otherwise all regulate defecation program in the animals, by acting on both anterior body contraction (*aboc*) and expulsion (*exp*). AEX-5 was previously shown to be secreted by the intestine and subsequently endocytosed by coelomocytes, an event regulated by the SNARE protein AEX-4, and to act on the GPCR AEX-2, which is at the surface of the motor neurons AVL and DVB, to regulate the defecation program [160]. To better characterize the role of *aex-5* in the early embryo, we first confirmed the results of RNAi depletion using a mutant allele. We used the allele *aex-5(sa23)*, which codes for a protein with a residue change in the P-domain (C443W), and *aex-5(sa23)* mutant animals display a strong defect in defecation but otherwise produce 100% viable embryos. We found that $52,3 \pm 12,3\%$ of *par-4;aex-5* mutant embryos grown at 18°C are viable, a significant increase compared to *par-4* single mutants. Embryonic viability of these double mutants was decreased to $4,5 \pm 4,8\%$ and 0% at the fully restrictive temperatures of 20°C and 25°C, indicating that some residual PAR-4 activity is required for the suppression effect. Taken together, these results indicate that *aex-5* is a specific suppressor of *par-4*.

We then asked whether the depletion of the other five *aex* genes could, like *aex-5*, suppress *par-4 (it57ts)* embryonic lethality. At 18°C, we found that only the depletion of *aex-4* could, like

aex-5, partially restore embryonic viability in *par-4* mutants, with 8.3% of embryos hatching. As AEX-4 is a snare protein required for secretion of AEX-5, this finding is compatible with the notion that AEX-5 exerts its effects on the PAR-4 pathway non-cell autonomously. We also found that the depletion of *aex-4* in *par-4;aex-5* double mutants didn't have a significant effect on embryonic lethality, as it showed a viability of $34,8 \pm 0,9\%$ (data not shown). This suggests that *aex-4* function as an upstream regulator of *aex-5* is necessary for its role in embryonic development.

Previous findings revealed that the specific expression of *aex-5* in intestinal cells is sufficient to rescue the defecation defect of *aex-5(sa23)* mutants [160], indicating that one of its main sites of activity is the intestine. We therefore asked whether production of AEX-5 in the intestine was sufficient to restore a high embryonic lethality in *par-4;aex-5* double mutants. We found that *par-4;aex-5* double mutant animals re-expressing AEX-5::VENUS in their intestine produced had no effect on embryonic viability (Figure 6D). This indicates that production and secretion of AEX-5 from the intestine does not impinge on embryogenesis and thus that the pool of AEX-5 that functions with PAR-4 in embryonic polarity and asymmetric cell division is at least partly distinct from that controlling the defecation program.

REFERENCES

- Alessi, D.R., Sakamoto, K., Bayascas, J.R., 2006. LKB1-dependent signaling pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 137-163.
- Benkemoun, L., Descoteaux, C., Chartier, N.T., Pintard, L., Labbe, J.C., 2014. PAR-4/LKB1 regulates DNA replication during asynchronous division of the early *C. elegans* embryo. *J. Cell Biol.* 205, 447-455.
- Brauchle, M., Baumer, K., Gönczy, P., 2003. Differential Activation of the DNA Replication Checkpoint Contributes to Asynchrony of Cell Division in *C. elegans* Embryos. *Curr. Biol.* 13, 819-827.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- Chartier, N.T., Salazar Ospina, D.P., Benkemoun, L., Mayer, M., Grill, S.W., Maddox, A.S., Labbe, J.C., 2011. PAR-4/LKB1 mobilizes nonmuscle myosin through anillin to regulate *C. elegans* embryonic polarization and cytokinesis. *Curr. Biol.* 21, 259-269.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2011. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27, 1164-1165.
- Doi, M., Iwasaki, K., 2002. Regulation of retrograde signaling at neuromuscular junctions by the novel C2 domain protein AEX-1. *Neuron* 33, 249-259.
- Fievet, B.T., Rodriguez, J., Naganathan, S., Lee, C., Zeiser, E., Ishidate, T., Shirayama, M., Grill, S., Ahringer, J., 2013. Systematic genetic interaction screens uncover cell polarity regulators and functional redundancy. *Nat. Cell Biol.* 15, 103-112.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Goldstein, B., Hird, S.N., 1996. Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 122, 1467-1474.
- Goldstein, B., Hird, S.N., White, J.G., 1993. Cell polarity in early *C. elegans* development. *Dev. Suppl.*, 279-287.
- Griffin, E.E., Odde, D.J., Seydoux, G., 2011. Regulation of the MEX-5 gradient by a spatially segregated kinase/phosphatase cycle. *Cell* 146, 955-968.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59, 307-321.

- Hird, S.N., White, J.G., 1993. Cortical and cytoplasmic flow polarity in early embryonic cells of *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 121, 1343-1355.
- Kamath, R.S., Ahringer, J., 2003. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 30, 313-321.
- Kamath, R.S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A.G., Ahringer, J., 2001. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* 2, RESEARCH0002.
- Kang, C.B., Hong, Y., Dhe-Paganon, S., Yoon, H.S., 2008. FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions. *Neurosignals* 16, 318-325.
- Kemphues, K.J., Priess, J.R., Morton, D.G., Cheng, N.S., 1988. Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* 52, 311-320.
- Kwon, Y.T., Xia, Z., An, J.Y., Tasaki, T., Davydov, I.V., Seo, J.W., Sheng, J., Xie, Y., Varshavsky, A., 2003. Female lethality and apoptosis of spermatocytes in mice lacking the UBR2 ubiquitin ligase of the N-end rule pathway. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8255-8271.
- Labbé, J.-C., Pacquelet, A., Marty, T., Gotta, M., 2006. A Genomewide Screen for Suppressors of *par-2* Uncovers Potential Regulators of PAR Protein-Dependent Cell Polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 174, 285-295.
- Le, S.Q., Gascuel, O., 2008. An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1307-1320.
- Lizcano, J.M., Goransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Makela, T.P., Hardie, D.G., Alessi, D.R., 2004. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 23, 833-843.
- Mahoney, T.R., Luo, S., Round, E.K., Brauner, M., Gottschalk, A., Thomas, J.H., Nonet, M.L., 2008. Intestinal signaling to GABAergic neurons regulates a rhythmic behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 16350-16355.
- Martin, S.G., St Johnston, D., 2003. A role for *Drosophila* LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity. *Nature* 421, 379-384.
- Morton, D.G., Roos, J.M., Kemphues, K.J., 1992. *par-4*, a gene required for cytoplasmic localization and determination of specific cell types in *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *Genetics* 130, 771-790.

- Munro, E., Nance, J., Priess, J.R., 2004. Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early *C. elegans* embryo. *Dev. Cell* 7, 413-424.
- Nakayama, K., 1997. Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem. J.* 327 (Pt 3), 625-635.
- Narbonne, P., Roy, R., 2006. Inhibition of germline proliferation during *C. elegans* dauer development requires PTEN, LKB1 and AMPK signalling. *Development* 133, 611-619.
- Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J., 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 302, 205-217.
- Rousselet, E., Benjannet, S., Marcinkiewicz, E., Asselin, M.-C., Lazure, C., Seidah, N.G., 2011. Proprotein Convertase PC7 Enhances the Activation of the EGF Receptor Pathway through Processing of the EGF Precursor. *J. Biol. Chem.* 286, 9185-9195.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676-682.
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Hamelin, J., Mamarbachi, A.M., Basak, A., Marcinkiewicz, J., Mbikay, M., ChrÉTien, M., Marcinkiewicz, M., 1999. The Subtilisin/Kexin Family of Precursor Convertases: Emphasis on PC1, PC2/7B2, POMC and the Novel Enzyme SKI-1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 885, 57-74.
- Spilker, A.C., Rabilotta, A., Zbinden, C., Labbe, J.C., Gotta, M., 2009. MAP kinase signaling antagonizes PAR-1 function during polarization of the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Genetics* 183, 965-977.
- Tenlen, J.R., Molk, J.N., London, N., Page, B.D., Priess, J.R., 2008. MEX-5 asymmetry in one-cell *C. elegans* embryos requires PAR-4- and PAR-1-dependent phosphorylation. *Development* 135, 3665-3675.
- Thacker, C., Rose, A.M., 2000. A look at the *Caenorhabditis elegans* Kex2/Subtilisin-like proprotein convertase family. *Bioessays* 22, 545-553.
- Timmons, L., Fire, A., 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395, 854.
- Wallace, I.M., O'Sullivan, O., Higgins, D.G., Notredame, C., 2006. M-Coffee: combining multiple sequence alignment methods with T-Coffee. *Nucleic Acids Res.* 34, 1692-1699.

- Watts, J.L., Morton, D.G., Bestman, J., Kempfues, K.J., 2000. The *C. elegans* par-4 gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development* 127, 1467-1475.
- Whelan, S., Goldman, N., 2001. A General Empirical Model of Protein Evolution Derived from Multiple Protein Families Using a Maximum-Likelihood Approach. *Mol. Biol. Evol.* 18, 691-699.
- Yem, A.W., Tomasselli, A.G., Henrikson, R.L., Zurcher-Neely, H., Ruff, V.A., Johnson, R.A., Deibel, M.R., 1992. The Hsp56 component of steroid receptor complexes binds to immobilized FK506 and shows homology to FKBP-12 and FKBP-13. *J. Biol. Chem.* 267, 2868-2871.

TABLES

TABLE 3.I. STRAINS USED IN THIS PAPER

N2	Wild-type Bristol strain
KK300	<i>par-4(it57) V</i>
KK184	<i>par-4(it47) V</i>
KK822	<i>par-1(zu310) V</i>
JJ1473	<i>unc-119(ed3) III; zuIs45[nmy-2::NMY-2::GFP + unc-119(+)] V</i>
UM122	<i>unc-119(ed3) III; zuIs45[nmy-2::NMY-2::GFP + unc-119(+)] V; par-4(it57ts) V</i>
JH2015	<i>unc-119(ed3) III; axIs1462[pie-1 prom:gfp:pie-1 ORF:pie-1 3', unc-119(+)].</i>
UM179	<i>unc-119(ed3) III; axIs1462[pie-1 prom:gfp:pie-1 ORF:pie-1 3', unc-119(+)]; par-4(it57) V</i>
UM207	<i>unc-119(ed3) III; axIs1462[pie-1 prom:gfp:pie-1 ORF:pie-1 3', unc-119(+)]; par-1(zu310) V</i>
JT23	<i>aex-5(sa23) I</i>
UM142	<i>aex-5(sa23)I; par-4(it57ts) V</i>
NM3576	<i>jsIs1072 [vha-6p::AEX-5::VENUS + Cbr-unc-119]</i>
UM466	<i>aex-5(sa23)I; par-4(it57ts)V; jsIs1072 [vha-6p::AEX-5::VENUS + Cbr-unc-119]</i>
UM274	<i>qIs56 par-4(it57) unc-51(e369)/qIs56 par-4(it57) fkb- (tm2614) V</i>

FIGURES

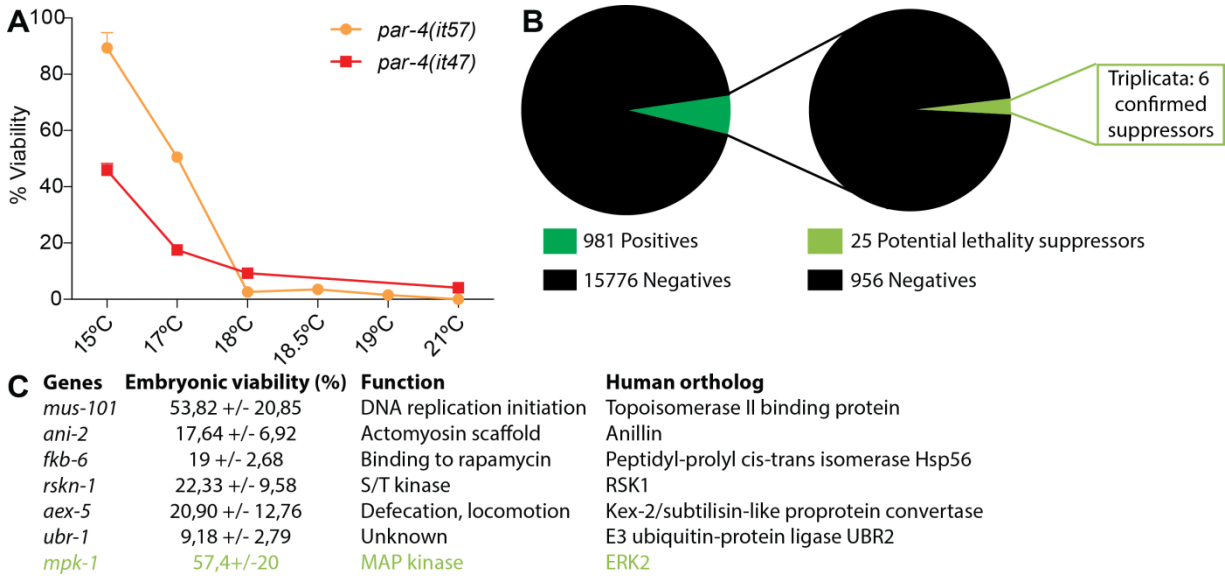


FIGURE 3.1. GENOME-WIDE RNAI SCREEN FOR SUPPRESSORS OF EMBRYONIC LETHALITY IN PAR-4 MUTANTS

(A) Embryonic viability of *par-4(it47)* (red) and *par-4(it57)* (orange) after 6 days of incubation at different temperatures. (B) Pipeline used to validate the hits. Using the Ahringer library of RNAi clones, we identified 981 genes that could suppress *par-4* embryonic lethality at 18°C. Of these 981 genes, 25 were confirmed as potential lethality suppressors. After a third replicate, 6 genes were identified as lethality suppressors. (C) The genes identified in the screen have various functions and mechanisms of action in *C. elegans*.

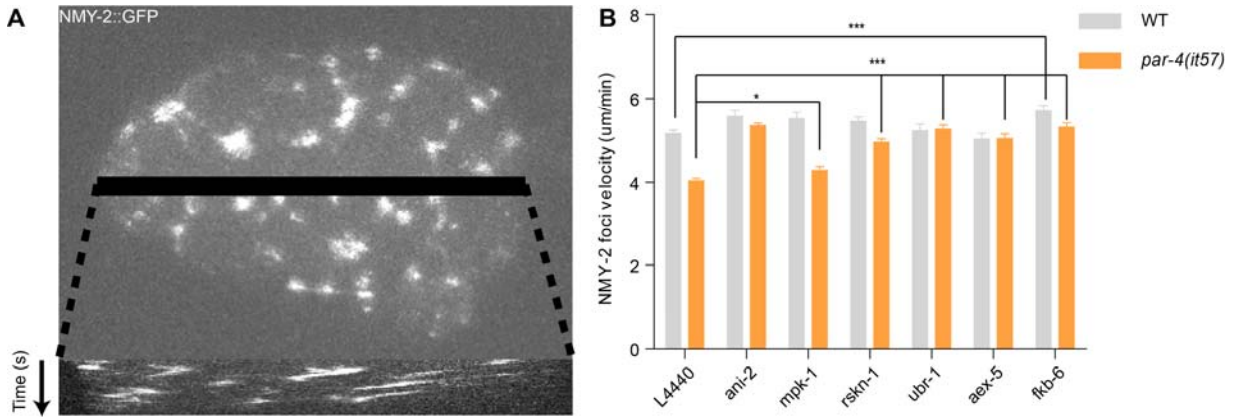


FIGURE 3.2. THE DEPLETION OF MPK-1, RSKN-1, UBR-1, FKB-6 AND AEX-5 RESTORES THE ACTOMYOSIN CONTRACTILITY IN A PAR-4 MUTANT

(A) Visualization of the quantification method. A kymograph is drawn using a maximal intensity projection of the cortex of an embryo expressing NMY-2::GFP, after fertilization. The anterior pole is located to the right side of the image. (B) Velocity of NMY-2::GFP foci in WT and *par-4(it57)* strains at 25°C for which the lethality suppressors have been depleted by RNAi. We used L4440 as a negative control. Deviation is expressed as standard deviation of the means. *: p-value < 0.05, ***: p-value < 0.005.

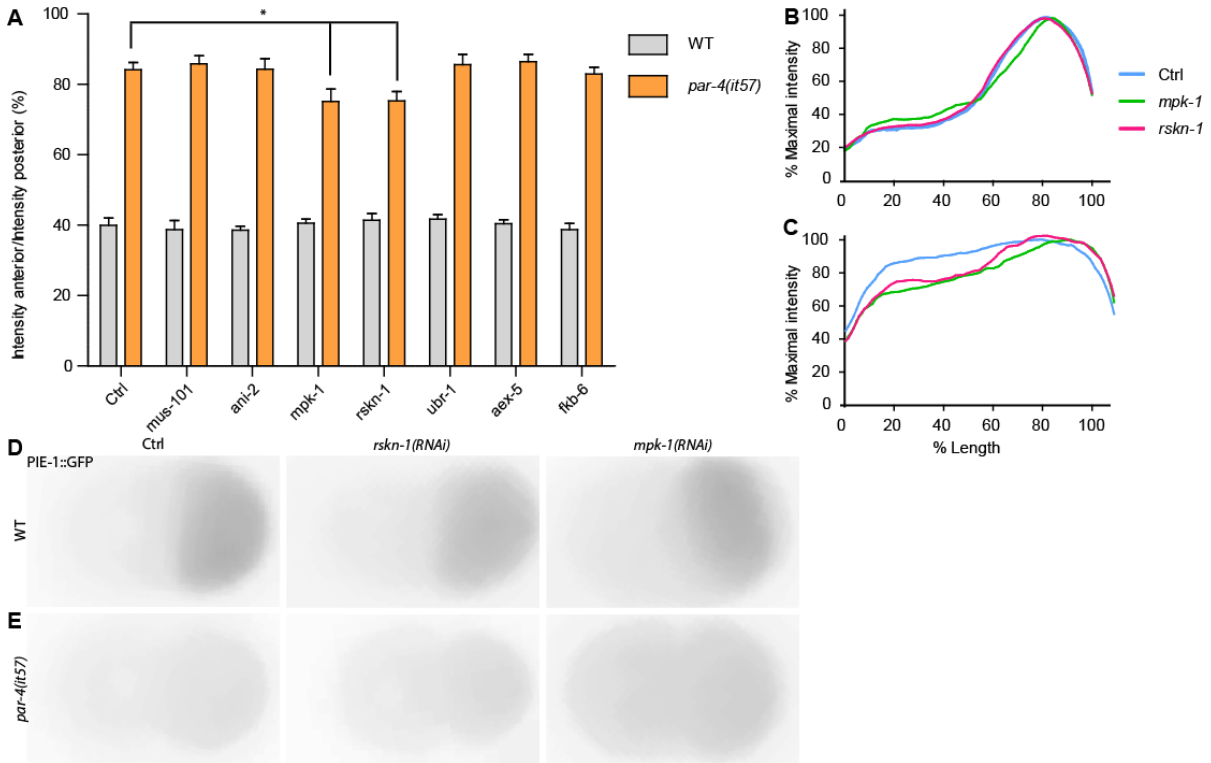


FIGURE 3.3. THE DEPLETION OF MPK-1 AND RSKN-1 PARTIALLY RESTORES THE SEGREGATION OF THE CELL FATE DETERMINANT PIE-1::GFP IN PAR-4 MUTANTS.

(A) Average ratio of the maximal intensity of fluorescence in the anterior and posterior poles, in a WT or a *par-4(it57)* strain expressing PIE-1::GFP at the semi-permissive temperature 20°C, for the depletion of the seven suppressors of lethality. We used the gene 6d5 as a negative control. *: p-value < 0.05. (B-C) Graphs representing the maximal intensity ratio over the percent of length of the embryo for WT (B) and *par-4(it57)* (C), with *mpk-1* and *rskn-1* RNAi. (D-E) PIE-1::GFP localization at 20°C with a 63X lens for *mpk-1* and *rskn-1* RNAi in WT (D) or *par-4(it57)* (E). We used the gene 6d5 as a negative control. *: p-value < 0.05, ***: p-value < 0.005.

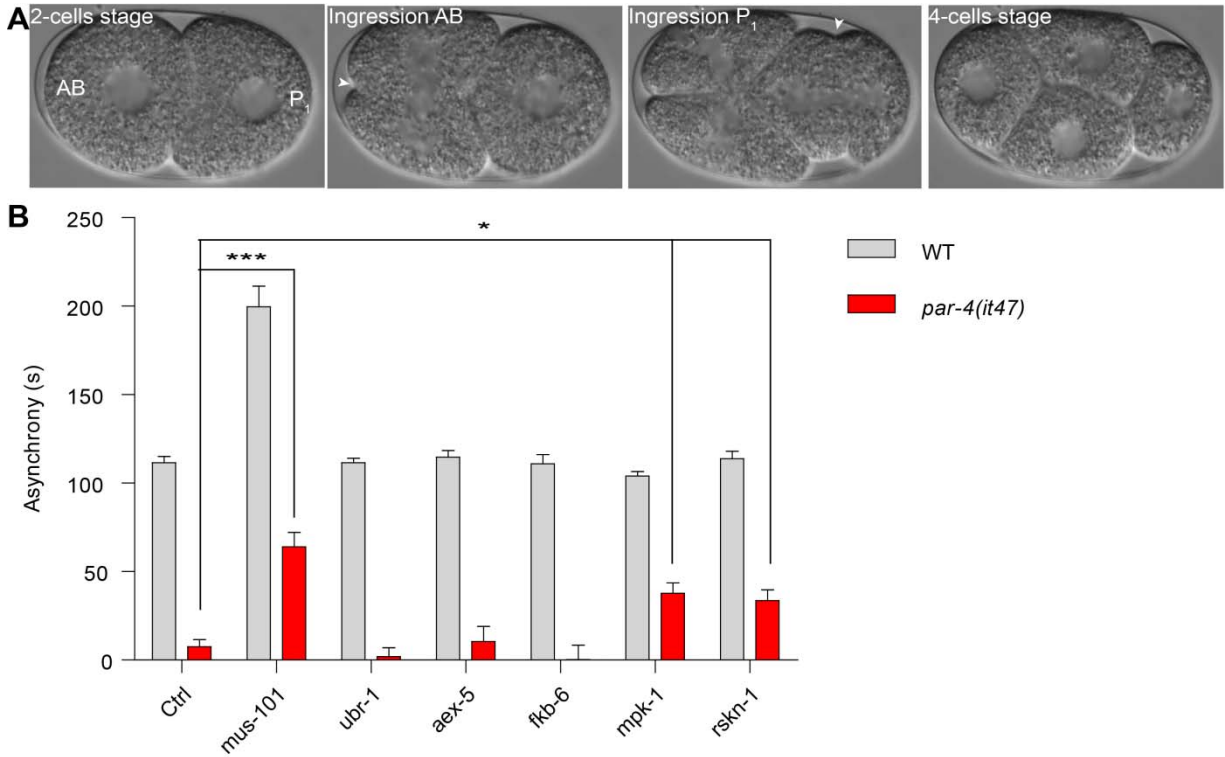


FIGURE 3.4. THE DEPLETION OF MPK-1 AND RSKN-1 PARTIALLY RESTORES THE ASYNCHRONY BETWEEN AB AND P1 IN PAR-4 AND PAR-1 MUTANTS.

(A) Visualization of the quantification method. An embryo is filmed during the second cell division, using differential interferential contrast. The anterior pole is located to the right side of the image. The white arrows show the ingression of AB and P1. (B) Asynchrony between AB and P1 in embryos depleted of the five lethality suppressors by RNAi for WT and *par-4(it47)* at 18°C. *: p-value < 0.05, ***: p-value < 0.005.

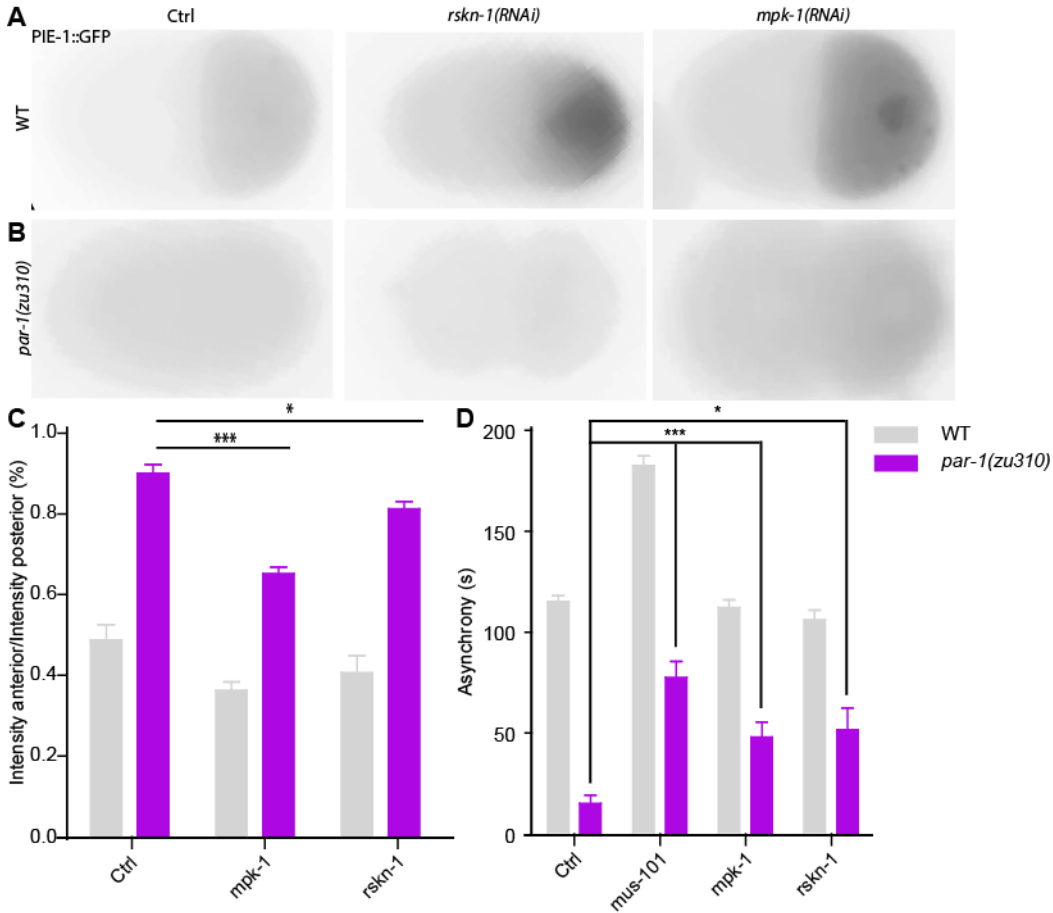


FIGURE 3.5. THE DEPLETION OF MPK-1 AND RSKN-1 PARTIALLY RESTORES THE SEGREGATION OF THE CELL FATE DETERMINANT PIE-1::GFP AND THE ASYNCHRONY BETWEEN AB AND P1 IN PAR-1 MUTANTS.

(A-B) PIE-1::GFP localization at the semi-permissive temperature 24°C with a 63X lens for *mpk-1* and *rskn-1* RNAi in WT (A) or in *par-1(zu310)* (B). (C) Average ratio of the maximal intensity of fluorescence in the anterior and posterior poles, in a WT or a *par-1(zu310)* strain expressing PIE-1::GFP at the semi-permissive temperature 24°C, for *mpk-1* and *rskn-1* RNAi. (D) Asynchrony between AB and P1 in embryos depleted of the five lethality suppressors by RNAi for WT and *par-1(zu310)* at 22°C. We used the gene *6d5* as a negative control. *: p-value < 0.05, ***: p-value < 0.005.

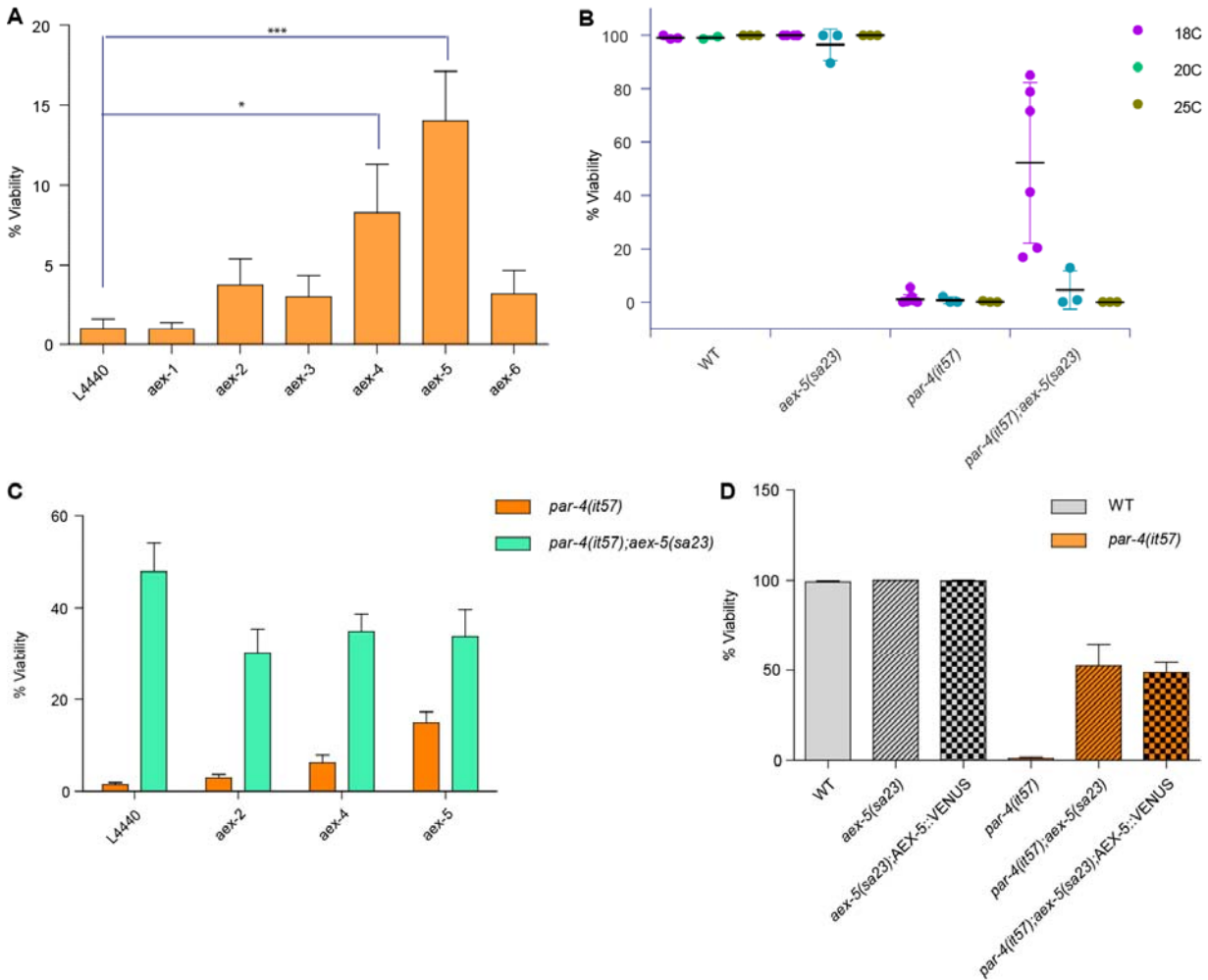


FIGURE 3.6. AEX-5 AFFECTS EMBRYONIC LETHALITY BY INTERACTING WITH PAR-4, BUT NOT FROM THE INTESTINE.

(A) Embryonic viability of the *C. elegans* *aex* genes depleted by RNAi in *par-4(it57)* strains at 18°C. (B) Embryonic viability of the allele *aex-5(sa23)*, for different temperatures, in a WT or a *par-4(it57)* background. (C) Embryonic viability of *par-4(it57);aex-5(sa23)* strains expressing or not *vha-6::AEX-5::VENUS*. *: p-value < 0.05. ***: p-value < 0.005.

SUPPLEMENTAL FIGURES

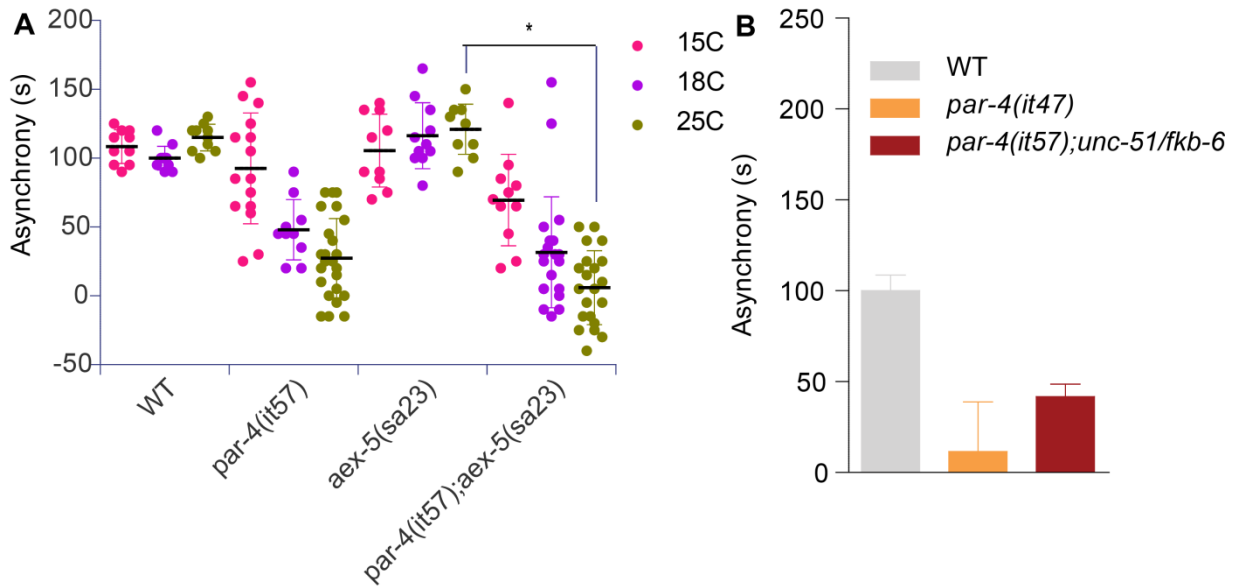


FIGURE 3.S1. ASYNCHRONY OF GENETIC STRAINS

Asynchrony between AB and P1 in *par-4(it57)* embryos, (A) for the allele *aex-5(sa23)*, at different temperatures or (B) for the heterozygous strain *unc-51(e369)/qIs56 fkb-6(tm2614)*, at 18°C.

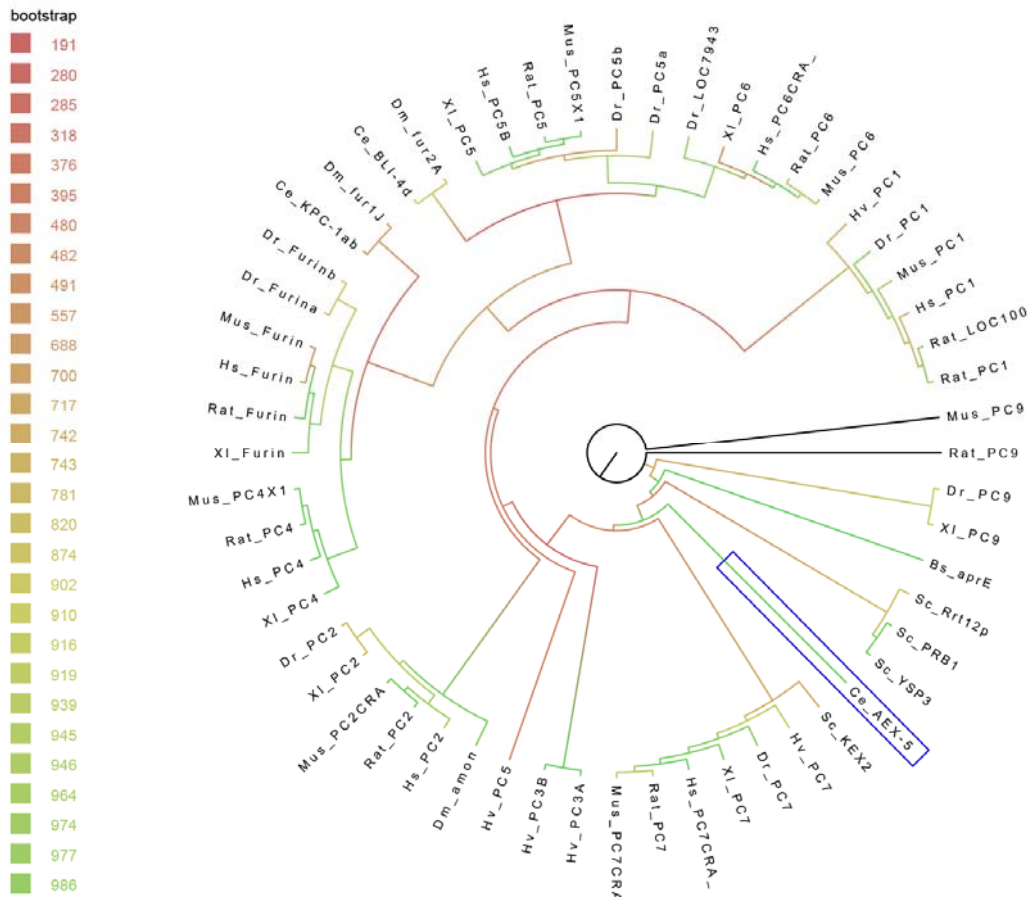


FIGURE S2. PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE PCS

Phylogenetic tree of all the PCs that were shown to have sequence homology to AEX-5 in *B subtilis*, *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *H. vulgaris*, *D. rerio*, *X. laevis*, *R. norvegicus*, *M. musculus* and *H. sapiens*. The sequences were aligned and evaluated using ClustalW2, Muscle and Mafft in M-Coffee. The tree was obtained by a 1000 bootstraps analysis in PhyML 3.0 and modified visually in FigTree. In the blue rectangle is shown AEX-5. The higher bootstraps values are shown in green and the lower ones in red.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

1. RÉCAPITULATION

PAR-4 est l'orthologue du suppresseur tumoral humain LKB1 chez *C. elegans*. Chez *C. elegans*, une mutation du gène *par-4* empêche l'établissement de la polarité en perturbant principalement trois processus cellulaires, soit la ségrégation asymétrique des déterminants cellulaires [89], la régulation asynchrone du cycle cellulaire [204] et la contractilité des filaments d'actomyosine [32, 101]. Comprendre le rôle de PAR-4 dans la polarisation et la division asymétrique de l'embryon précoce de *C. elegans* pourrait permettre d'élucider le rôle de LKB1 dans la polarisation cellulaire et, éventuellement, de comprendre comment cette kinase agit comme suppresseur de tumeur. Un tel développement pourrait offrir de nouvelles pistes thérapeutiques pour traiter les patients atteints du syndrome de Peutz-Jeghers.

Dans le but de mieux comprendre *par-4* et son rôle dans l'établissement de la polarité, nous avons effectué un criblage pangénomique par interférence à l'ARN pour identifier de nouveaux gènes agissant avec *par-4*. Ce criblage a mené à l'identification de sept suppresseurs de la létalité causée par une mutation de *par-4* : *ani-2*, *mus-101*, *mpk-1*, *rskn-1*, *aex-5*, *ubr-1* et *fkf-6*. PAR-4 et les gènes identifiés dans le crible sont conservés chez l'humain.

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les sept gènes suppresseurs de la létalité embryonnaire identifiés précédemment jouent tous un rôle dans au moins une des trois voies de régulation de la polarité de l'embryon impliquant *par-4*. Pour ce faire, nous avons entrepris de positionner ces suppresseurs dans la voie de signalisation de PAR-4, en procédant à deux objectifs spécifiques, soit d'analyser de manière fonctionnelle les suppresseurs de *par-4* et de définir le rôle de chacun des suppresseurs de létalité dans les voies régies par *par-4* lors de la polarisation de l'embryon.

2. *PAR-4*, LA RÉGULATION DES CYCLES CELLULAIRES D'AB ET P1 ET LA SÉGRÉGATION DES DÉTERMINANTS CELLULAIRES

Avec le Dr. Benkemoun, nous avons d'abord entrepris d'étudier le rôle du suppresseur tumoral *mus-101* dans la polarité (Chapitre 2). Par la suite, nous avons entamé d'étudier l'asynchronie des autres suppresseurs de létalité (Chapitre 3). Nous avons trouvé que la déplétion par ARNi ou à l'aide d'allèles mutants de *mus-101* dans des mutants *par-4* et *par-1* ne supprimait que la synchronie entre les cellules AB et P1, sans affecter les autres voies de signalisation régies par *par-4*. Nous avons également montré que la déplétion par ARNi de *mpk-1* et *rskn-1* dans des mutants *par-4* et *par-1* supprimait partiellement la synchronie des cellules AB et P1 et la perte de ségrégation du déterminant cellulaire PIE-1::GFP.

MUS-101 est l'homologue de la protéine de liaison à la topoisomérase II et régule l'initiation de la réplication [196]. Au cours des expérimentations, le Dr Benkemoun a mis au point une puissante technique d'imagerie pour déterminer dans quel blastomère la réplication est la plus active. Cet essai est basé sur la présence au noyau de PCNA, la pince protéique qui permet de stabiliser la liaison de la polymérase sur l'ADN durant la réplication. En employant cette technique pour investiguer davantage le rôle de *mus-101* dans la voie de régulation du cycle cellulaire en amont de *par-4*, nous avons trouvé que PAR-4 active PAR-1 dans le blastomère P1 pour y empêcher la réplication de l'ADN avant l'entrée en phase S et que cette fonction est médiée par MUS-101 (Voir Chapitre 1, 3.3.1). Cela a pour effet de créer un écart entre les durées des cycles cellulaires d'AB et P1, expliquant ainsi l'asynchronie de division cellulaire observée dans ces blastomères [65, 204]. Également, la perte de *mus-101* seul augmente l'asynchronie des cycles cellulaires d'AB et P1, ce qui prouve son rôle dans l'inhibition de l'entrée en phase S de P1. Nous avons finalement montré que PAR-4 et PAR-1 agissent probablement au niveau de l'activation des origines de réplication dans le blastomère P1, plutôt qu'au niveau du recrutement de celles-ci, mais les molécules médiant cette interaction demeurent inconnues [204].

En poursuivant l'étude du rôle des autres suppresseurs de létalité dans la réplication de l'ADN des blastomères AB et P1, nous avons identifié *rskn-1* et *mpk-1* comme deux régulateurs potentiels de cette voie de signalisation de *par-4*. RSKN-1 est l'orthologue de la kinase à sérine/thréonine humaine RSK1 de la famille p90, qui fonctionne en amont des MAP kinases dans le développement de la lignée germinale [146]. Les kinases p90 jouent un rôle dans de nombreux processus cellulaires, tels que la traduction et le métabolisme. MPK-1 est l'orthologue de la MAP kinase ERK2, qui phosphoryle RSK1. Elle est activée par Ras [148]. Les MAP kinases régulent la

différenciation cellulaire et le développement [149]. Nos résultats confirment des études précédemment publiées qui montraient une relation entre MPK-1, PAR-4, PAR-1 et PIE-1 dans l'établissement de la polarité embryonnaire [150, 159]. Cependant, les mécanismes régulant ces interactions demeurent incompris.

Nous avons donc identifié trois gènes régulant l'activité de *par-4* dans la réplication de l'ADN. Nous ne savons pas s'ils interagissent entre eux et si c'est le cas, comment. Nous avons cependant observé que la déplétion de chacune des deux kinases dans des mutants *par-4* et *par-1* restaurait partiellement l'asymétrie de PIE-1::GFP dans l'embryon précoce, mais que ce n'était pas le cas lors de la déplétion de *mus-101*. Ces résultats suggèrent que *mpk-1* et *rskn-1*, mais pas *mus-101*, interagissent avec *par-4* et *par-1* pour réguler les voies de signalisation de réplication de l'ADN et de ségrégation des déterminants cellulaires. De plus, chez l'humain, ERK2 phosphoryle RSK1 pour réguler la croissance cellulaire. Cela suggère que MPK-1 puisse phosphoryler RSKN-1 pour l'activer. Il n'est pas clair toutefois si *mpk-1* et *rskn-1* agissent en amont de *mus-101* pour réguler l'entrée en phase S du blastomère P1 ou s'ils agissent dans des voies de signalisation différentes.

Pour mieux comprendre l'interaction de MPK-1 et RSKN-1 avec PAR-4 et PAR-1 dans la régulation des cycles cellulaires d'AB et P1, nous envisageons de procéder au même essai employant la PCNA que nous avons mis au point précédemment. Des études ont déjà montré l'implication de MAPK et de RSK dans l'inhibition de l'entrée en phase S d'embryons d'étoile de mer, d'échinoïdes ou d'urochordés [236-239]. Nous supposons donc que nous observerons que la déplétion de *mpk-1* et *rskn-1* dans des mutants *par-4* et *par-1* affectera davantage la réplication dans le blastomère P1, car celui-ci doit normalement voir sa réplication d'ADN retardée. Éventuellement, des doubles inactivations de *mpk-1* et *rskn-1* par ARNi ou par mutation, ainsi que des essais kinases et des analyses protéomiques seraient utiles pour vérifier que ces deux protéines interagissent ensemble.

3. PAR-4 ET LA CONTRACTILITÉ DES FILAMENTS D'ACTOMYOSINE CORTICAUX

J'ai montré que la déplétion par RNAi d'*aex-5*, *ubr-1*, *mpk-1*, *rskn-1* et *fkf-6* restaure une contractilité normale d'actomyosine dans des mutants *par-4* (Chapitre 3). Ces gènes s'ajoutent donc à *ani-2* dans la liste des gènes régulateurs de la contractilité corticale interagissant avec *par-4* [101].

3.1. La proprotéine convertase AEX-5

AEX-5 est une KEX-2/pseudo-subtilisine proprotéine convertase active dans les neurones moteurs et qui régit la défécation de *C. elegans*. Mes résultats suggèrent pour la première fois une fonction pour ce gène durant le développement de *C. elegans* et impliquent aussi que PAR-4 contrôle la contractilité du cytosquelette d'actomyosine durant la phase de polarisation embryonnaire par clivage protéique.

L'analyse phylogénétique que nous avons menée pour caractériser l'homologie d'AEX-5 avec les autres PCs nous a permis de déterminer que la séquence d'AEX-5 est similaire à celles de PC7 chez les mammifères et de KEX2, Rrt12p, PRB1 et YSP3 chez *S. cerevisiae*. PC7 est impliquée dans le système dopaminergique et régule le métabolisme du fer [240]. Elle-même présente une très forte homologie avec KEX2, ce qui en fait probablement la plus ancienne PC [235, 241]. PRB1 et YSP3 sont des subtilisines paralogues qui régulent la dégradation protéique [242-244], alors que Rrt12p est une subtilisine qui régule la transcription de l'ADN ribosomal [245]. Selon ces résultats, AEX-5 serait donc une PC qui serait très proche évolutivement des premières endopeptidases identifiées chez la levure et qui régulent la division cellulaire, ce qui pourrait expliquer son implication dans un événement aussi crucial que le développement embryonnaire.

Mes résultats impliquent que le SNARE AEX-4 pourrait conserver sa fonction connue pour permettre l'excrétion d'AEX-5, mais que cette interaction n'aurait pas lieu à partir de l'intestin pour réguler la polarité embryonnaire [160]. De plus, AEX-5 n'agirait pas sur le GPCR AEX-2, ce qui suggère une nouvelle voie de signalisation pour *aex-5*. Pour identifier depuis quelle structure AEX-5 est excrétée, il serait utile d'évaluer l'expression d'*aex-5* dans l'embryon précoce. Or, l'expression d'AEX-5 dans l'embryon de *C. elegans* a été mesurée sur des puces à ADN par Itai Yanai à partir du stade quatre-cellules seulement. Il n'existe pas non plus d'anticorps nous permettant d'observer la localisation d'AEX-5 dans l'embryon précoce. Nous envisageons donc d'exprimer AEX-5 fusionnée à VENUS, une variante de la GFP. Cette protéine de fusion sera ensuite exprimée dans différentes structures, telles que la gonade ou l'embryon, grâce à des promoteurs spécifiques.

Nous tenterons ainsi d'établir lesquelles de ces souches, lorsque croisées avec le double mutant *par-4(it57);aex-5(sa23)* permettent de restaurer la létalité des mutants *par-4*.

Nous cherchons à déterminer comment AEX-5, dont l'expression dans les premiers stades embryonnaires n'a pas été caractérisée, pourrait agir avec PAR-4 sur la contractilité de l'actomyosine corticale. Sachant qu'AEX-5 est une proprotéine convertase et que ses substrats ont été très peu caractérisés, mais également que la contractilité corticale peut être entravée par la matrice extracellulaire (MEC), nous émettons l'hypothèse qu'AEX-5 pourrait cliver certains éléments constituant ou agissant sur la MEC, pour ainsi promouvoir la contraction de l'actomyosine corticale.

La MEC de l'embryon de *C. elegans* est constituée de la base laminaire, un assemblage complexe de glycoprotéines et de protéoglycans.

La base laminaire s'associe à la fibronectine et au collagène non-fibreux de type XVIII pour permettre l'adhésion de la MEC à la cellule. Les glycoprotéines sont des protéines fibreuses qui sont liées à des chaînes d'oligosaccharides :

- Les laminines constituent le principal élément structural de la base laminaire. Elles sont des protéines hétérotrimériques constituées de trois chaînes (α , β et γ) qui s'assemblent par leur tête.
- Le collagène de type IV permet la formation du réseau constituant la base laminaire. Il est fait de trois chaînes protéiques enroulées en superhélice qui s'assemblent pour former un feuillet.
- Le nidogène est une petite glycoprotéine qui permet de relier les laminines au réseau de collagène de type IV.

Les protéoglycans sont constitués de glycosaminoglycans (GAG), par exemple l'héparan sulfate, et de protéines. Ils lient des protéines pour par exemple réguler la prolifération de la cellule ou pour activer des protéases qui dégradent des composants de la MEC.

- Le perlecan est constitué de 2 à 15 chaînes d'héparan sulfate et permet de lier le réseau de collagène de type IV aux laminines.

- Le syndecan, le glypican et l'agrine sont des protéines transmembranaires dont le domaine intracellulaire lie les filaments d'actine pour permettre la signalisation entre la MEC et la cellule.

Les protéoglycans pourraient potentiellement interagir avec AEX-5. En effet, tel que mentionné plus tôt, les protéoglycans permettent l'activation locale de protéases qui dégradent la MEC. Il a été montré que les cellules pour lesquelles ces enzymes ont été inactivées génétiquement ne parviennent pas à modifier leur cytosquelette adéquatement pour permettre la division cellulaire. Aussi, les cellules n'exprimant pas certains protéoglycans ne parviennent généralement pas à établir une polarité normale et à se diviser [246-248]. De plus, il existe deux types de protéases de la MEC : les métalloprotéases et les protéases à sérine. AEX-5 étant une endoprotéase à sérine, il serait plausible qu'AEX-5 interagisse avec les protéoglycans de la base laminaire pour permettre la dégradation de la MEC et ainsi favoriser la contraction du cytosquelette d'actomyosine de l'embryon de *C. elegans* durant l'établissement de la polarité. Cela irait dans la même direction que les résultats de Tornero et al, qui ont montré que chez la tomate, la protéine P69B de la famille des protéases Kex2/pseudo-subtilisine est impliquée dans le clivage de protéines de la MEC durant la pathogénèse [249].

Le positionnement d'AEX-5 dans cette voie permet de supposer que cette protéine influe sur la compétition entre ANI-1 et ANI-2 dans le contrôle de la contractilité cellulaire. Éventuellement, il serait intéressant de tester cette hypothèse en analysant les changements dans la localisation et les niveaux des protéines impliquées dans la contractilité corticale en aval de PAR-4, notamment ANI-1 et ANI-2, pour déterminer si certaines de ces composantes sont régulées par clivage protéique. L'imagerie en temps réel permettra de suivre la localisation des protéines impliquées dans la contractilité grâce à des souches de *C. elegans* exprimant plusieurs de ces protéines fusionnées à la GFP, pour lesquelles *aex-5* sera déplété ou non par interférence à l'ARN.

3.2. L'E3 ubiquitine ligase UBR-1

ubr-1 code pour une E3 ubiquitine ligase qui est homologue à UBR2 chez l'humain. Sa fonction spécifique chez *C. elegans* est jusqu'à maintenant inconnue, mais nos résultats suggèrent qu'elle soit impliquée dans la régulation de la contractilité des filaments d'actomyosine.

Des études ont déjà montré que la contractilité du cytosquelette de l'embryon précoce de *C. elegans* est en partie régulée par des mécanismes de protéolyse par ubiquitination [250, 251]. Un bon exemple est celui de PAR-2, une protéine à doigt de zinc qui agit probablement à titre de

E3 ligase pour réguler l'établissement de la polarité [90, 252]. Récemment, le groupe de Kenneth Kemphues a montré que la déplétion d'enzymes déubiquitinatrices (DUB) comme MATH-33, USP-47 et USP-46 augmente le phénotype de létalité embryonnaire des mutants *par-1*, *par-2* et *par-4* et crée des phénotypes similaires à celui de *par-2* pour le cycle cellulaire, la localisation du fuseau mitotique et la taille des blastomères AB et P1. Ils ont proposé que la déubiquitination permettrait de stabiliser des protéines agissant sur l'association des centrosomes au cortex, une étape ayant lieu après la fertilisation. De plus, ces interactions semblent conservées évolutivement [253, 254]. Jumelées à nos résultats, ces informations suggèrent que des protéines impliquées dans l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome comme MATH-33, USP-47 et UBR-1 pourraient permettre de réguler l'établissement de la polarité embryonnaire en interagissant avec PAR-4 et peut-être même PAR-1. Il serait donc intéressant éventuellement de tester l'effet sur la vitesse des agglomérations d'actomyosine de la déplétion de *math-33*, *usp-47* et *usp-46* et de vérifier si une triple déplétion de ces DUB avec *ubr-1* et *par-4* restaure le phénotype mutant *par-4*, avant de vérifier si UBR-1 et ces DUB agissent dans la même voie de signalisation.

3.3. L'immunophiline FKB-6

Nos résultats suggèrent également un rôle pour *fkf-6* dans la régulation de la contractilité des filaments d'actomyosine corticaux. En effet, la déplétion de *fkf-6* par ARNi dans des mutants *par-4* restaure une vitesse normale de migration de NMY-2::GFP vers le pôle antérieur.

L'interaction entre *fkf-6* et *par-4* dans la polarité embryonnaire et la contractilité de l'actomyosine a déjà été montrée, mais peu caractérisée [151]. Un récent criblage génétique par Fievet et al a montré que *fkf-6* supprime la létalité embryonnaire de mutants *par-4* et *let-502* [159]. LET-502 est une kinase à serine/threonine qui se lie à Rho pour réguler la contraction de l'actomyosine. Une autre caractéristique intéressante de LET-502 est qu'elle est inhibée par MPK-1 durant la morphogénèse de la vulve de *C. elegans* [255]. Or, nos résultats de vitesse de NMY-2::GFP ont montré que la déplétion de *mpk-1* et *rskn-1* supprimait le phénotype des mutants *par-4* dans cette voie, ce qui suggère leur implication dans la régulation de la contractilité corticale de l'embryon précoce.

En tenant compte de ces informations et de nos résultats, il est plausible de se demander si FKB-6 pourrait interagir avec LET-502 pour réguler la contraction de l'actomyosine durant l'établissement de la polarité dans l'embryon précoce et si cette interaction nécessiterait l'action de PAR-4. Également, il serait possible que LET-502 soit régulé par les kinases MPK-1 et RSKN-1.

Des analyses plus poussées sur la vélocité de contractilité de l'actomyosine dans l'embryon précoce et sur la co-localisation de ces protéines nous permettraient de répondre à ces questions. Particulièrement, il serait important de déterminer si *let-502* est un effecteur de la voie de régulation de *par-4* ou s'il agit dans une voie de signalisation différente.

3.4. Les kinases RSKN-1 et MPK-1

L'identification de MPK-1 et RSKN-1 en tant que régulateurs de cette voie de signalisation suggère que ces deux kinases puissent agir en amont de la voie de signalisation de PAR-1 pour réguler les processus régissant la division cellulaire asymétrique. Pour vérifier ceci, il serait intéressant d'étudier la localisation de PAR-1 dans des embryons déplétés de *mpk-1* et *rskn-1*. Si PAR-1, normalement situé au cortex du pôle postérieur, perd sa localisation dans ces embryons, nous pourrions conclure que MPK-1 et RSKN-1 agissent en amont de cette protéine. Par contre, il est possible qu'aucun effet ne soit observé, car les protéines PAR interagissent entre elles pour réguler leur expression. Il faudra donc éventuellement aussi vérifier si la déplétion de *mpk-1* ou *rskn-1* affecte la phosphorylation de PAR-1 par PAR-4.

CONCLUSION : PAR-4 ET LA DIVISION CELLULAIRE ASYMÉTRIQUE

Dans ce mémoire, j'ai identifié sept interacteurs potentiels de PAR-4 qui agissent dans ses diverses voies de régulation de la polarité (Figure 4.1). Les résultats obtenus et les pistes apportées ouvrent la porte à de nombreuses questions et hypothèses concernant leur rôle précis dans ces voies et les interactions qu'ils ont entre eux.

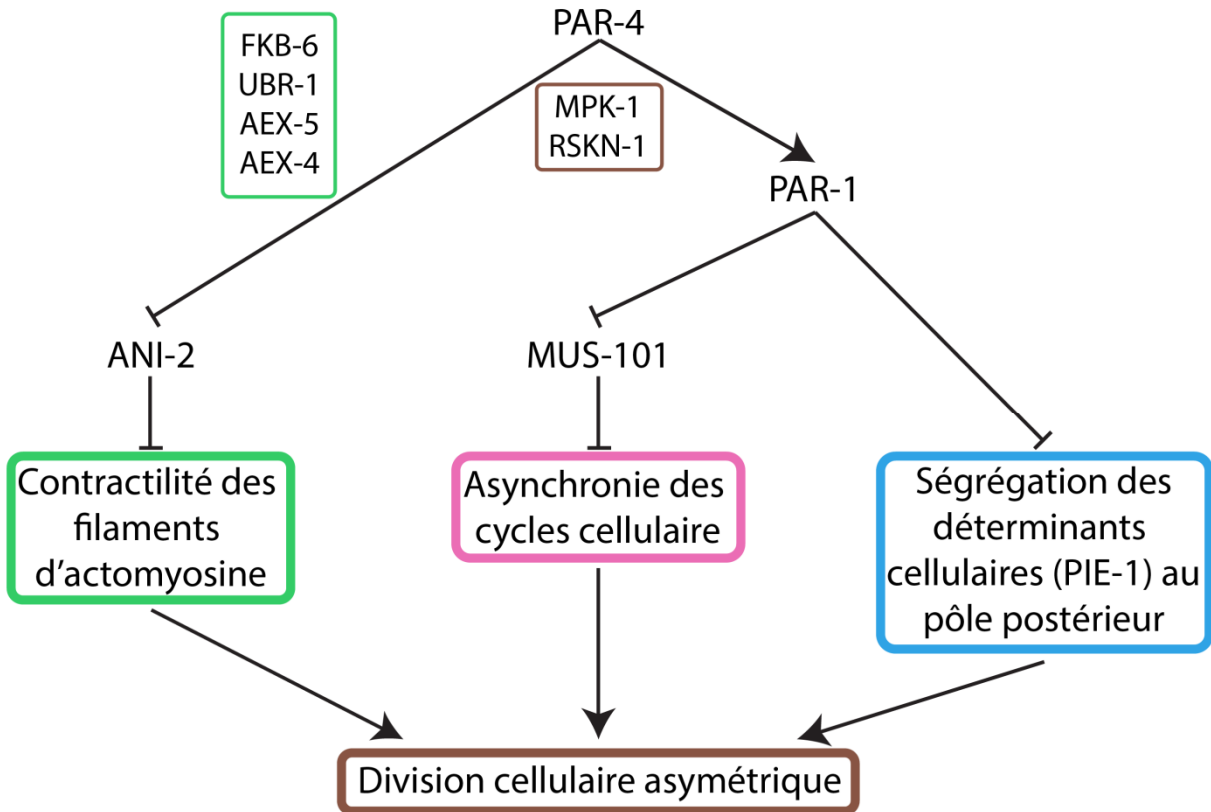


FIGURE 4.1. VOIES DE SIGNALISATION DE PAR-4

Notamment, j'ai montré que PAR-4 interagit avec FKB-6, une protéine liant la rapamycine, pour réguler la contractilité des filaments d'actomyosine. Connaissant l'implication de PAR-4/LKB1 dans la régulation de l'énergie cellulaire avec l'AMPK et le complexe mTOR [86, 87, 114, 116, 256], il est légitime de supposer que l'énergie cellulaire puisse réguler cette voie de la polarité avec PAR-4. En fait, la contractilité du cortex, qui consiste en la première étape dans l'établissement de l'asymétrie de l'embryon, pourrait être une étape cruciale à ce processus. En effet, tous les suppresseurs de létalité identifiés lors du criblage agissent sur la vélocité des filaments d'actomyosine, à l'exception de *mus-101*. Leurs effets sur cette voie semblent varier, mais ces résultats suggèrent que le rôle de PAR-4 dans cette voie soit particulièrement important pour

l'établissement de la polarité. Il reste à déterminer si PAR-4 agit sur ce processus via une seule voie de signalisation qui intégrerait à la fois l'énergie cellulaire, l'ubiquitination, la compétition d'ANI-2 et le clivage protéique, ou via plusieurs voies.

À l'opposé, mes analyses suggèrent que l'asynchronie soit une conséquence de l'asymétrie, plutôt qu'un processus la régulant. L'asynchronie *per se* ne serait donc pas essentielle pour rétablir la viabilité embryonnaire. Cette hypothèse est supportée par le fait que la déplétion génétique d'*ani-2*, *fkf-6* ou *aex-5* ne montre aucun effet sur l'asynchronie. Elle permettrait également d'expliquer l'effet de *mus-101*, une protéine impliquée dans la réplication de l'ADN, dans cette voie plutôt que dans celle de la contractilité. Il serait effectivement possible que MUS-101 soit activée suite à l'établissement de la polarité pour réguler l'asynchronie.

Finalement, j'ai identifié un rôle pour la proprotéine convertase AEX-5 dans la régulation de la contractilité corticale avec PAR-4. La maturation d'AEX-5 via AEX-4 semble importante pour son rôle dans ce processus, mais la structure depuis laquelle AEX-5 est excrétée pour remplir sa fonction dans l'embryon demeure à identifier. Identifier cette structure permettra de déterminer si AEX-5 agit de manière autocrine ou paracrine dans l'embryon. Selon mes connaissances, AEX-5 serait la première endoprotéase à avoir été identifiée en tant que régulatrice de la fonction de PAR-4 dans cette voie. Il sera intéressant de déterminer quels sont les substrats d'AEX-5 et comment ils agissent pour réguler la fonction de PAR-4 dans la contractilité des filaments d'actomyosine.

Toutes les expérimentations effectuées dans le cadre de ce mémoire l'ont été par analyse génétique des allèles thermosensibles de *par-4*, soit *it57* et *it47*. Dans le but d'éliminer l'hypothèse selon laquelle les supresseurs de létalité pourraient permettre un meilleur repliement de la protéine PAR-4 thermosensible, il serait intéressant d'effectuer des analyses biochimiques de la fonction directe de PAR-4, par exemple en effectuant des essais kinases dans des conditions entraînant la perte de fonction des supresseurs. Si la perte de fonction des supresseurs n'entraîne pas une restauration de la fonction kinase de PAR-4 à 25°C, cela pourrait éliminer cette hypothèse. Éventuellement, des doubles inactivations de supresseurs et des analyses phénotypiques plus détaillées permettront également de valider les prédictions fonctionnelles détaillées ici.

Avec les informations répertoriées dans ce mémoire, ces expériences pourraient contribuer à obtenir une meilleure définition des événements de signalisation qui sont contrôlés

par PAR-4/LKB1 lors de la polarisation et de la division cellulaire asymétrique de l'embryon de *C. elegans*, ainsi que dans la prolifération cellulaire.

INDEX ANALYTIQUE

A

Actine	15, 18, 36, 120
Actomyosine.....	14, 16, 18, 19, 23, 24, 26, 30, 36, 39, 40, 50, 63, 75, 85, 86, 88, 91, 93, 96, 115, 118, 121, 123
AEX-2.....	33, 97, 118
AEX-4.....	33, 97, 118, 124
AEX-5.....	31, 32, 40, 91, 94, 97, 109, 110, 111, 115, 118, 124
Allèle.....	5, 26, 50, 58, 88, 89, 91, 93, 94, 97, 109, 110, 116
AMP kinase	26, 27, 28, 57, 86
Anaphase	9
ANI-1	26, 36, 91, 120
ANI-2	26, 31, 36, 40, 75, 91, 93, 95, 115, 118, 120
Anilline.....	36, 91
Anticorps.....	61
Arbre phylogénétique	90, 111
ARNi.....	<i>Voir Interférence par ARNs</i>
Asynchronie.....	14, 20, 25, 26, 30, 39, 40, 48, 49, 50, 52, 53, 56, 57, 70, 71, 85, 86, 89, 93, 94, 96, 115, 116
Axe antéropostérieur	13
Axe antéro-postérieur.....	60
Axe antéro-postérieur.....	86

B

Blastomère AB.....	14, 20, 22, 25, 27, 30, 39, 49, 51, 52, 53, 57, 62, 72, 76, 79, 86, 89, 93, 107, 108, 110, 116, 121
Blastomère P1	14, 20, 21, 25, 27, 30, 39, 49, 51, 52, 53, 57, 62, 72, 76, 86, 89, 91, 93, 107, 108, 110, 116, 121

C

Cancer	3, 28
Catherine Descoteaux.....	46, 64, 84, 99
Cellule souche	12, 13
Cellules souches germinales.....	3, 9, 10, 20, 27, 40
Centrosome.....	9, 14, 16, 19, 20, 22, 86, 121
Chromosome.....	3, 5, 9, 10, 73
Cœlomocyte.....	33
Coelomocyte.....	97
Complexe mTOR.....	<i>Voir mTOR</i>
Complexe PAR-3/PAR-6/PKC-3.....	14, 16, 19, 23, 24
Corentin Monfort.....	64, 84
Cortex embryonnaire	14, 16, 18, 19, 23, 36, 39, 60, 88, 93, 105, 121, 122
Criblage pangénomique.....	50, 85, 87, 88, 91, 94, 97, 104
Cycle cellulaire	5, 7, 21, 24, 26, 32, 39, 40, 48, 49, 50, 52, 53, 56, 57, 85, 86, 89, 93, 94, 96, 115, 116, 121
Cytokinèse.....	9, 10, 22, 36
Cytosquelette	15, 24, 36, 39, 86, 118, 121

D

Défécation	32, 35, 92, 97, 118
Déterminant cellulaire.....	12, 13, 14, 17, 20, 24, 25, 26, 30, 31, 39, 40, 49, 50, 60, 63, 75, 85, 86, 89, 93, 96, 106, 108, 115, 116
Dissolution des membranes nucléaires.....	53, 60, 70
Division cellulaire asymétrique	11, 13, 19, 20, 26, 30, 39, 42, 54, 57, 85, 86, 91, 97, 115, 122, 125
Dominant.....	5, 36
Dommmages à l'ADN	7, 21, 35

E

E3 ubiquitine ligase.....	21, 35, 92, 120
Embryon précoce	13, 16, 21, 23, 24, 26, 30, 39, 115, 117, 118, 121, 122, 125
ERK2	<i>Voir</i> MAP kinase

F

Facteur de transcription	20, 21
FKB-6.....	31, 32, 40, 91, 93, 94, 110, 115, 118, 121
Fuseau mitotique.....	9, 12, 25, 60, 86, 121

G

Gonade.....	3, 25, 36, 119
-------------	----------------

H

Hermaphrodite.....	3, 4, 61, 62
Hétérozygote.....	5, 73
Homozygote.....	5, 49, 58, 73

I

Imagerie	42, 48, 53, 54, 60, 62, 85, 94, 116
Immunophiline.....	32, 91
Intensité de fluorescence	53, 60, 62, 75, 76, 79, 89, 94, 96, 106, 108
Interférence par ARNs.....	30, 50, 52, 54, 56, 59, 70, 71, 73, 77, 87, 88, 89, 91, 94, 97, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 116, 118, 121
Interphase	6, 9, 10, 36
Intestin.....	3, 33, 97, 118

J

Jean-Claude Labbé	64, 100
-------------------------	---------

K

KEX2	32, 34, 35, 91, 97, 118
Kymographe	88, 105

L

L1 Voir Larve	
L2 Voir Larve	
L3 Voir Larve	
L4 Voir Larve	
Larve.....	3, 30, 88
Laura Benkemoun.....	46, 47, 84, 99, 116
LET-502.....	122
Létalité embryonnaire	26, 30, 31, 32, 39, 42, 50, 59, 84, 85, 86, 88, 89, 91, 93, 97, 104, 105, 106, 107, 108, 115, 116, 119, 121
Lignage	3, 13
Lionel Pintard	64, 99
LKB1	25, 27, 30, 39, 47, 50, 56, 57, 85, 86, 115, 125

M

Mâle.....	3, 4, 10, 16
MAP kinases	Voir MPK-1
MARK.....	Voir PAR-1
Matrice extracellulaire.....	119
Méiose.....	5, 9, 10, 11
Métaphase	9
MEX-5.....	Voir MEX-5/6
MEX-5/6.....	14, 20, 22, 26, 31
MEX-6.....	Voir MEX-5/6
Microtubules	9, 19
Mitose.....	5, 8, 9, 11, 22, 27, 49, 55, 86
MPK-1.....	31, 40, 92, 93, 94, 96, 106, 108, 115, 116, 118, 122
mTOR.....	27, 28, 32, 123
MUS-101	31, 35, 40, 50, 52, 53, 55, 57, 58, 61, 63, 73, 75, 79, 91, 93, 94, 115, 116, 124
Myosine.....	15, 18, 26, 36, 39, 88

N

Nicolas Chartier	40, 46, 64, 84, 99
NMY-2	16, 24, 60, 75, 93, 105, 121

O

Origines de réplication.....	7, 53, 54, 57, 116
------------------------------	--------------------

P

PAR-1.....	14, 19, 20, 24, 25, 26, 31, 39, 48, 49, 50, 56, 57, 85, 86, 96, 116, 121, 122
PAR-2.....	14, 17, 19, 24, 121
PAR-3.....	14, 16, 19, 23, 24
PAR-4.....	23, 24, 25, 27, 30, 36, 39, 42, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 56, 57, 85, 86, 88, 89, 91, 93, 96, 97, 104, 105, 106, 107, 109, 110, 115, 116, 118, 121, 123
PAR-5.....	23, 24
PAR-6.....	14, 16, 19, 23, 24
Paulina Salazar.....	64, 84, 99
PCNA.....	7, 21, 53, 56, 62, 63, 72, 76, 116
Phase G1.....	5
Phase G2.....	5
Phase M.....	5, 7, 22
Phase S.....	5, 7, 10, 21, 49, 51, 53, 54, 57, 60, 62, 70, 72, 77, 79, 91, 116
PIE-1.....	<i>Voir Déterminant cellulaire</i>
Points de contrôle.....	7, 21, 49, 52, 54, 56, 71
Polarité.....	11, 16, 19, 23, 25, 26, 30, 31, 39, 40, 42, 48, 49, 56, 57, 85, 86, 91, 97, 115, 116, 118, 121, 123
Pôle antérieur.....	14, 16, 19, 20, 22, 23, 25, 26, 39, 49, 51, 60, 75, 86, 93, 105, 106, 107, 108, 121
Pôle postérieur.....	3, 13, 16, 19, 20, 23, 24, 25, 39, 48, 49, 51, 54, 86, 93, 106, 108, 122
Polymérase.....	7, 20, 54, 116
Prométaphase.....	9
Prophase.....	9
Proprotéine convertase.....	32, 33, 89, 92, 97, 111, 118
Protéines PAR.....	14, 23, 24, 26, 39, 48, 49, 86, 122

Q

Quiescence.....	6, 10, 27
-----------------	-----------

R

Rapamycine.....	32, 123
Récessif.....	5
Recombinaison homologue.....	10
Réplication de l'ADN.....	124
Réplication de l'ADN.....	5, 7, 9, 14, 21, 35, 47, 48, 49, 52, 53, 56, 57, 62, 63, 71, 91, 94, 116
RNAi.....	<i>Voir Interférence par ARNs</i>
RSK1.....	<i>Voir RSKN-1</i>
RSKN-1.....	31, 40, 92, 93, 94, 96, 106, 108, 115, 116, 118, 122

S

Subtilisine.....	<i>Voir Proprotéine convertase</i>
Syndrôme de Peutz-Jeghers.....	27, 115
Syndrôme de Peutz-Jeghers.....	85

T

Télophase	9
<i>Threshold</i>	54, 72, 76
Topoisomérase.....	35, 116

U

UBR-1	31, 35, 40, 92, 93, 115, 118, 120
-------------	-----------------------------------

V

Validation des origines	<i>Voir Origines de réplication</i>
Vélocité	60, 75, 88, 93, 96

BIBLIOGRAPHIE

1. Sulston, J.E., et al., *The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1983. **100**(1): p. 64-119.
2. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*, in Chapter 8: Manipulating Proteins, DNA and RNA, Chapter 16: The Cytoskeleton, Chapter 17: The Cell Cycle, Chapter 19: Cell junctions, Cell Adhesion and the Extracellular Matrix, Chapter 21: Sexual Reproduction: Meiosis, Germ Cells, and Fertilization, Chapter 22: Development of Multicellular Organisms. 2008, Garland Science: New York. p. 1268 p.
3. Altun, Z.F. and D.H. Hall, *Introduction to C. elegans anatomy*, in *In WormAtlas*. 2009.
4. Sulston, J.E. and H.R. Horvitz, *Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1977. **56**(1): p. 110-56.
5. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochimie*, in 1.4. Genetics: A review. 2004, John Wiley & sons: Bruxelles. p. 1586 p.
6. RicochetCreativeProductionsInc. *What is the link between BRCA1 and cancer?* In Ricochet Science 2013; Available from: <http://ricochetscience.com/brca1-cancer/>.
7. Gillespie, P., A. Li, and J.J. Blow, *Reconstitution of licensed replication origins on Xenopus sperm nuclei using purified proteins*. BMC Biochemistry, 2001. **2**(1): p. 15.
8. Remus, D., et al., *Concerted Loading of Mcm2-7 Double Hexamers around DNA during DNA Replication Origin Licensing*. Cell, 2009. **139**(4): p. 719-730.
9. Evrin, C., et al., *A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(48): p. 20240-20245.
10. Blow, J.J. and A. Dutta, *Preventing re-replication of chromosomal DNA*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(6): p. 476-486.
11. DePamphilis, M.L., et al., *Regulating the licensing of DNA replication origins in metazoa*. Current Opinion in Cell Biology, 2006. **18**(3): p. 231-239.
12. Sonnevile, R., et al., *The dynamics of replication licensing in live Caenorhabditis elegans embryos*. J Cell Biol, 2012. **196**(2): p. 233-46.
13. Moyer, S.E., P.W. Lewis, and M.R. Botchan, *Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(27): p. 10236-10241.
14. Ilves, I., et al., *Activation of the MCM2-7 Helicase by Association with Cdc45 and GINS Proteins*. Molecular Cell, 2010. **37**(2): p. 247-258.
15. Iyama, T. and D.M. Wilson, 3rd, *DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells*. DNA Repair (Amst), 2013. **12**(8): p. 620-36.
16. Samuel, T., H.O. Weber, and J.O. Funk, *Linking DNA damage to cell cycle checkpoints*. Cell Cycle, 2002. **1**(3): p. 162-8.
17. Saltsman, K. *Chapter 4: Cellular Reproduction: Multiplication by Division*. Inside the Cell 2011; Available from: <http://publications.nigms.nih.gov/insidethecell/chapter4.html>.
18. Pham, K., F. Sacirbegovic, and S.M. Russell, *Polarised cells, polarised views: Asymmetric cell division in hematopoietic cells*. Frontiers in Immunology, 2014. **5**.
19. Inaba, M. and Yukiko M. Yamashita, *Asymmetric Stem Cell Division: Precision for Robustness*. Cell Stem Cell, 2012. **11**(4): p. 461-469.
20. Knoblich, J.A., *Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division*. Cell, 2008. **132**(4): p. 583-597.
21. Li, R., *The Art of Choreographing Asymmetric Cell Division*. Developmental Cell, 2013. **25**(5): p. 439-450.

22. Gómez-López, S., R. Lerner, and C. Petritsch, *Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2014. **71**(4): p. 575-597.
23. Zhang, D., Y. Wang, and S. Zhang, *Asymmetric Cell Division in Polyploid Giant Cancer Cells and Low Eukaryotic Cells*. BioMed Research International, 2014. **2014**: p. 8.
24. Wilson, A. and A. Trumpp, *Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 93-106.
25. Cuenca, A.A., et al., *Polarization of the C. elegans zygote proceeds via distinct establishment and maintenance phases*. Development, 2003. **130**(7): p. 1255-65.
26. Goldstein, B., S.N. Hird, and J.G. White, *Cell polarity in early C. elegans development*. Dev Suppl, 1993: p. 279-87.
27. Goldstein, B. and S.N. Hird, *Specification of the anteroposterior axis in Caenorhabditis elegans*. Development, 1996. **122**(5): p. 1467-74.
28. Wallenfang, M.R. and G. Seydoux, *Polarization of the anterior-posterior axis of C. elegans is a microtubule-directed process*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 89-92.
29. Cowan, C.R. and A.A. Hyman, *Centrosomes direct cell polarity independently of microtubule assembly in C. elegans embryos*. Nature, 2004. **431**(7004): p. 92-96.
30. Hird, S.N. and J.G. White, *Cortical and cytoplasmic flow polarity in early embryonic cells of Caenorhabditis elegans*. J Cell Biol, 1993. **121**(6): p. 1343-55.
31. Hodge, A.J., *Studies on the structure of muscle. III. Phase contrast and electron microscopy of dipteran flight muscle*. J Biophys Biochem Cytol, 1955. **1**(4): p. 361-80.
32. Munro, E., J. Nance, and J.R. Priess, *Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early C. elegans embryo*. Dev Cell, 2004. **7**(3): p. 413-24.
33. Hayashi, T., *Contractile properties of compressed monolayers of actomyosin*. J Gen Physiol, 1952. **36**(2): p. 139-52.
34. Jenkins, N., J.R. Saam, and S.E. Mango, *CYK-4/GAP Provides a Localized Cue to Initiate Anteroposterior Polarity upon Fertilization*. Science, 2006. **313**(5791): p. 1298-1301.
35. Hung, T.J. and K.J. Kemphues, *PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in Caenorhabditis elegans embryos*. Development, 1999. **126**(1): p. 127-35.
36. Cheng, N.N., C.M. Kirby, and K.J. Kemphues, *Control of cleavage spindle orientation in Caenorhabditis elegans: the role of the genes par-2 and par-3*. Genetics, 1995. **139**(2): p. 549-59.
37. Lin, D., et al., *A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(8): p. 540-7.
38. Schonegg, S., et al., *The Rho GTPase-activating proteins RGA-3 and RGA-4 are required to set the initial size of PAR domains in Caenorhabditis elegans one-cell embryos*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(38): p. 14976-81.
39. Schmutz, C., J. Stevens, and A. Spang, *Functions of the novel RhoGAP proteins RGA-3 and RGA-4 in the germ line and in the early embryo of C. elegans*. Development, 2007. **134**(19): p. 3495-3505.
40. Leung, T., et al., *The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(10): p. 5313-27.
41. Qiu, R.G., A. Abo, and G. Steven Martin, *A human homolog of the C. elegans polarity determinant Par-6 links Rac and Cdc42 to PKCzeta signaling and cell transformation*. Curr Biol, 2000. **10**(12): p. 697-707.

42. Hutterer, A., et al., *Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during Drosophila embryogenesis*. *Dev Cell*, 2004. **6**(6): p. 845-54.
43. Joberty, G., et al., *The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(8): p. 531-9.
44. Gotta, M., M.C. Abraham, and J. Ahringer, *CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in C. elegans*. *Current Biology*, 2001. **11**(7): p. 482-488.
45. Motegi, F. and A. Sugimoto, *Sequential functioning of the ECT-2 RhoGEF, RHO-1 and CDC-42 establishes cell polarity in Caenorhabditis elegans embryos*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(9): p. 978-985.
46. Schonegg, S. and A.A. Hyman, *CDC-42 and RHO-1 coordinate acto-myosin contractility and PAR protein localization during polarity establishment in C. elegans embryos*. *Development*, 2006. **133**(18): p. 3507-16.
47. Cowan, C.R. and A.A. Hyman, *Acto-myosin reorganization and PAR polarity in C. elegans*. *Development*, 2007. **134**(6): p. 1035-43.
48. Johansson, A., M. Driessens, and P. Aspenstrom, *The mammalian homologue of the Caenorhabditis elegans polarity protein PAR-6 is a binding partner for the Rho GTPases Cdc42 and Rac1*. *J Cell Sci*, 2000. **113 (Pt 18)**: p. 3267-75.
49. Aceto, D., M. Beers, and K.J. Kemphues, *Interaction of PAR-6 with CDC-42 is required for maintenance but not establishment of PAR asymmetry in C. elegans*. *Developmental Biology*, 2006. **299**(2): p. 386-397.
50. Watts, J.L., et al., *par-6, a gene involved in the establishment of asymmetry in early C. elegans embryos, mediates the asymmetric localization of PAR-3*. *Development*, 1996. **122**(10): p. 3133-40.
51. Motegi, F., et al., *Microtubules induce self-organization of polarized PAR domains in Caenorhabditis elegans zygotes*. *Nat Cell Biol*, 2011. **13**(11): p. 1361-1367.
52. Motegi, F. and G. Seydoux, *The PAR network: redundancy and robustness in a symmetry-breaking system*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013. **368**(1629): p. 20130010.
53. Shulman, J.M., R. Benton, and D. St Johnston, *The Drosophila Homolog of C. elegans PAR-1 Organizes the Oocyte Cytoskeleton and Directs oskar mRNA Localization to the Posterior Pole*. *Cell*, 2000. **101**(4): p. 377-388.
54. Mello, C.C., et al., *The pie-1 and mex-1 genes and maternal control of blastomere identity in early C. elegans embryos*. *Cell*, 1992. **70**(1): p. 163-76.
55. Mello, C.C., et al., *The PIE-1 protein and germline specification in C. elegans embryos*. *Nature*, 1996. **382**(6593): p. 710-2.
56. Tenenhaus, C., C. Schubert, and G. Seydoux, *Genetic requirements for PIE-1 localization and inhibition of gene expression in the embryonic germ lineage of Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 1998. **200**(2): p. 212-24.
57. Reese, K.J., et al., *Asymmetric segregation of PIE-1 in C. elegans is mediated by two complementary mechanisms that act through separate PIE-1 protein domains*. *Mol Cell*, 2000. **6**(2): p. 445-55.
58. Seydoux, G., et al., *Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of C. elegans*. *Nature*, 1996. **382**(6593): p. 713-6.
59. Seydoux, G. and M.A. Dunn, *Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of Caenorhabditis elegans and Drosophila melanogaster*. *Development*, 1997. **124**(11): p. 2191-201.
60. Batchelder, C., et al., *Transcriptional repression by the Caenorhabditis elegans germ-line protein PIE-1*. *Genes & Development*, 1999. **13**(2): p. 202-212.

61. Zhang, F., et al., *A model of repression: CTD analogs and PIE-1 inhibit transcriptional elongation by P-TEFb*. *Genes & Development*, 2003. **17**(6): p. 748-758.
62. Bowerman, B., et al., *The maternal gene *skn-1* encodes a protein that is distributed unequally in early *C. elegans* embryos*. *Cell*, 1993. **74**(3): p. 443-52.
63. Schubert, C.M., et al., *MEX-5 and MEX-6 function to establish soma/germline asymmetry in early *C. elegans* embryos*. *Mol Cell*, 2000. **5**(4): p. 671-82.
64. Tenlen, J.R., et al., *MEX-5 asymmetry in one-cell *C. elegans* embryos requires PAR-4- and PAR-1-dependent phosphorylation*. *Development*, 2008. **135**(22): p. 3665-75.
65. Brauchle, M., K. Baumer, and P. Gönczy, *Differential Activation of the DNA Replication Checkpoint Contributes to Asynchrony of Cell Division in *C. elegans* Embryos*. *Current Biology*, 2003. **13**(10): p. 819-827.
66. Schierenberg, E. and W.B. Wood, *Control of cell-cycle timing in early embryos of *Caenorhabditis elegans**. *Developmental Biology*, 1985. **107**(2): p. 337-354.
67. Gotta, M. and J. Ahringer, *Distinct roles for G[alpha] and G[beta][gamma] in regulating spindle position and orientation in *Caenorhabditis elegans* embryos*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(3): p. 297-300.
68. Schumacher, B., A. Alpi, and A. Garter, *Cell Cycle: Check for Asynchrony*. *Current Biology*, 2003. **13**(14): p. R560-R562.
69. Matsuoka, S., et al., *ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage*. *Science*, 2007. **316**(5828): p. 1160-6.
70. Cimprich, K.A. and D. Cortez, *ATR: an essential regulator of genome integrity*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(8): p. 616-27.
71. Abraham, R.T., *Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases*. *Genes & Development*, 2001. **15**(17): p. 2177-2196.
72. Summers, K.C., et al., *Phosphorylation: The Molecular Switch of Double-Strand Break Repair*. *International Journal of Proteomics*, 2011. **2011**: p. 373816.
73. Liu, Q., et al., *Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint*. *Genes & Development*, 2000. **14**(12): p. 1448-1459.
74. Reinhardt, H.C. and M.B. Yaffe, *Kinases that Control the Cell Cycle in Response to DNA Damage: Chk1, Chk2, and MK2*. *Current opinion in cell biology*, 2009. **21**(2): p. 245-255.
75. Garcia-Muse, T. and S.J. Boulton, *Distinct modes of ATR activation after replication stress and DNA double-strand breaks in *Caenorhabditis elegans**. *The EMBO Journal*, 2005. **24**(24): p. 4345-4355.
76. Archambault, V. and D.M. Glover, *Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(4): p. 265-275.
77. Budirahardja, Y. and P. Gönczy, *PLK-1 asymmetry contributes to asynchronous cell division of *C. elegans* embryos*. *Development*, 2008. **135**(7): p. 1303-1313.
78. Rivers, D.M., et al., *PAR proteins direct asymmetry of the cell cycle regulators Polo-like kinase and Cdc25*. *The Journal of Cell Biology*, 2008. **180**(5): p. 877-885.
79. Cheeks, R.J., et al., **C. elegans* PAR proteins function by mobilizing and stabilizing asymmetrically localized protein complexes*. *Curr Biol*, 2004. **14**(10): p. 851-62.
80. Morton, D.G., et al., *The *Caenorhabditis elegans* *par-5* gene encodes a 14-3-3 protein required for cellular asymmetry in the early embryo*. *Dev Biol*, 2002. **241**(1): p. 47-58.
81. Kemphues, K.J., et al., *Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos*. *Cell*, 1988. **52**(3): p. 311-20.
82. Watts, J.L., et al., *The *C. elegans* *par-4* gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry*. *Development*, 2000. **127**(7): p. 1467-75.

83. Boyd, L., et al., *PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in C. elegans embryos*. Development, 1996. **122**(10): p. 3075-84.
84. Etemad-Moghadam, B., S. Guo, and K.J. Kemphues, *Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early C. elegans embryos*. Cell, 1995. **83**(5): p. 743-52.
85. Guo, S. and K.J. Kemphues, *par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed*. Cell, 1995. **81**(4): p. 611-20.
86. Lizcano, J.M., et al., *LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1*. EMBO J, 2004. **23**(4): p. 833-43.
87. Alessi, D.R., K. Sakamoto, and J.R. Bayascas, *LKB1-dependent signaling pathways*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 137-63.
88. Benton, R. and D. St Johnston, *Drosophila PAR-1 and 14-3-3 inhibit Bazooka/PAR-3 to establish complementary cortical domains in polarized cells*. Cell, 2003. **115**(6): p. 691-704.
89. Morton, D.G., J.M. Roos, and K.J. Kemphues, *par-4, a gene required for cytoplasmic localization and determination of specific cell types in Caenorhabditis elegans embryogenesis*. Genetics, 1992. **130**(4): p. 771-90.
90. Levitan, D.J., et al., *par-2, a gene required for blastomere asymmetry in Caenorhabditis elegans, encodes zinc-finger and ATP-binding motifs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(13): p. 6108-12.
91. Freemont, P.S., I.M. Hanson, and J. Trowsdale, *A novel cysteine-rich sequence motif*. Cell, 1991. **64**(3): p. 483-4.
92. Lovering, R., et al., *Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(6): p. 2112-6.
93. Lorick, K.L., et al., *RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11364-9.
94. Fu, H., R.R. Subramanian, and S.C. Masters, *14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2000. **40**(1): p. 617-647.
95. Drewes, G., et al., *MARK, a Novel Family of Protein Kinases That Phosphorylate Microtubule-Associated Proteins and Trigger Microtubule Disruption*. Cell, 1997. **89**(2): p. 297-308.
96. Capra, M., et al., *Frequent Alterations in the Expression of Serine/Threonine Kinases in Human Cancers*. Cancer Research, 2006. **66**(16): p. 8147-8154.
97. Huang, N.N., et al., *MEX-3 interacting proteins link cell polarity to asymmetric gene expression in Caenorhabditis elegans*. Development, 2002. **129**(3): p. 747-59.
98. Hurd, D.D. and K.J. Kemphues, *PAR-1 is required for morphogenesis of the Caenorhabditis elegans vulva*. Dev Biol, 2003. **253**(1): p. 54-65.
99. Labbé, J.-C., et al., *A Genomewide Screen for Suppressors of par-2 Uncovers Potential Regulators of PAR Protein-Dependent Cell Polarity in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2006. **174**(1): p. 285-295.
100. Hemminki, A., et al., *A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome*. Nature, 1998. **391**(6663): p. 184-187.
101. Chartier, N.T., et al., *PAR-4/LKB1 mobilizes nonmuscle myosin through anillin to regulate C. elegans embryonic polarization and cytokinesis*. Curr Biol, 2011. **21**(4): p. 259-69.
102. Narbonne, P., et al., *Differential requirements for STRAD in LKB1-dependent functions in C. elegans*. Development, 2010. **137**(4): p. 661-70.

103. Wang, J.W., Y. Imai, and B. Lu, *Activation of PAR-1 kinase and stimulation of tau phosphorylation by diverse signals require the tumor suppressor protein LKB1*. *J Neurosci*, 2007. **27**(3): p. 574-81.
104. Martin, S.G. and D. St Johnston, *A role for Drosophila LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity*. *Nature*, 2003. **421**(6921): p. 379-84.
105. Woods, A., et al., *LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade*. *Curr Biol*, 2003. **13**(22): p. 2004-8.
106. Grahame Hardie, D., *AMP-activated protein kinase: a key regulator of energy balance with many roles in human disease*. *Journal of Internal Medicine*, 2014. **276**(6): p. 543-559.
107. Gowans, Graeme J., et al., *AMP Is a True Physiological Regulator of AMP-Activated Protein Kinase by Both Allosteric Activation and Enhancing Net Phosphorylation*. *Cell Metabolism*, 2013. **18**(4): p. 556-566.
108. Lee, J.H., et al., *Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase*. *Nature*, 2007. **447**(7147): p. 1017-20.
109. Nezu, J.-i., A. Oku, and M. Shimane, *Loss of Cytoplasmic Retention Ability of Mutant LKB1 Found in Peutz-Jeghers Syndrome Patients*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. **261**(3): p. 750-755.
110. Boudeau, J., G. Sapkota, and D.R. Alessi, *LKB1, a protein kinase regulating cell proliferation and polarity*. *FEBS Lett*, 2003. **546**(1): p. 159-65.
111. Baas, A.F., et al., *Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD*. *Embo j*, 2003. **22**(12): p. 3062-72.
112. Boudeau, J., et al., *Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex*. *Journal of Cell Science*, 2004. **117**(26): p. 6365-6375.
113. Hawley, S., et al., *Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRADalpha/beta and MO25alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade*. *Journal of Biology*, 2003. **2**(4): p. 28.
114. Narbonne, P. and R. Roy, *Inhibition of germline proliferation during C. elegans dauer development requires PTEN, LKB1 and AMPK signalling*. *Development*, 2006. **133**(4): p. 611-9.
115. Gems, D., et al., *Two Pleiotropic Classes of daf-2 Mutation Affect Larval Arrest, Adult Behavior, Reproduction and Longevity in Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1998. **150**(1): p. 129-155.
116. Jansen, M., et al., *LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(3): p. 777-98.
117. Sanchez-Cespedes, M., *A role for LKB1 gene in human cancer beyond the Peutz-Jeghers syndrome*. *Oncogene*, 2007. **26**(57): p. 7825-32.
118. Jenne, D.E., et al., *Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase*. *Nat Genet*, 1998. **18**(1): p. 38-43.
119. Wang, Z.-J., et al., *Allelic imbalance at the LKB1 (STK11) locus in tumours from patients with Peutz-Jeghers' syndrome provides evidence for a hamartoma-(adenoma)-carcinoma sequence*. *The Journal of Pathology*, 1999. **188**(1): p. 9-13.
120. Resta, N., et al., *STK11 mutations in Peutz-Jeghers syndrome and sporadic colon cancer*. *Cancer Res*, 1998. **58**(21): p. 4799-801.
121. Giardiello, F.M., et al., *Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(6): p. 1447-53.
122. Jeghers, H., K.V. Mc, and K.H. Katz, *Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits; a syndrome of diagnostic significance*. *N Engl J Med*, 1949. **241**(25): p. 993, illust; passim.

123. Peutz, J.L., *Over een zeer merkwaardige, gecombineerde familiale pollyposis van de sligmliezen van den tractus intestinalis met die van de neuskeelholte en gepaard met eigenaardige pigmentaties van huid-en slijmvliezen.* Ned Tijdschr Geneesk, 1921. **10**: p. 134-146.
124. Young, R.H., G.R. Dickersin, and R.E. Scully, *A distinctive ovarian sex cord-stromal tumor causing sexual precocity in the Peutz-Jeghers syndrome.* Am J Surg Pathol, 1983. **7**(3): p. 233-43.
125. Cantu, J.M., et al., *Peutz-Jeghers syndrome with feminizing sertoli cell tumor.* Cancer, 1980. **46**(1): p. 223-8.
126. Spigelman, A.D., V. Murday, and R.K. Phillips, *Cancer and the Peutz-Jeghers syndrome.* Gut, 1989. **30**(11): p. 1588-90.
127. Nakau, M., et al., *Hepatocellular Carcinoma Caused by Loss of Heterozygosity in Lkb1 Gene Knockout Mice.* Cancer Research, 2002. **62**(16): p. 4549-4553.
128. Trau, H., et al., *Peutz-Jeghers syndrome and bilateral breast carcinoma.* Cancer, 1982. **50**(4): p. 788-92.
129. Shen, Z., et al., *The tumor suppressor gene LKB1 is associated with prognosis in human breast carcinoma.* Clin Cancer Res, 2002. **8**(7): p. 2085-90.
130. Contreras, C.M., et al., *Loss of Lkb1 Provokes Highly Invasive Endometrial Adenocarcinomas.* Cancer Research, 2008. **68**(3): p. 759-766.
131. Sanchez-Cespedes, M., et al., *Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung.* Cancer Res, 2002. **62**(13): p. 3659-62.
132. Fernandez, P., et al., *Distinctive gene expression of human lung adenocarcinomas carrying LKB1 mutations.* Oncogene, 2004. **23**(29): p. 5084-91.
133. Sanchez-Cespedes, M., *The role of LKB1 in lung cancer.* Fam Cancer, 2011. **10**(3): p. 447-53.
134. Carretero, J., et al., *Novel and natural knockout lung cancer cell lines for the LKB1/STK11 tumor suppressor gene.* Oncogene, 2004. **23**(22): p. 4037-40.
135. Matsumoto, S., et al., *Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers.* Oncogene, 2007. **26**(40): p. 5911-5918.
136. Gurusurthy, S., et al., *LKB1 Deficiency Sensitizes Mice to Carcinogen-Induced Tumorigenesis.* Cancer Research, 2008. **68**(1): p. 55-63.
137. Hezel, A.F., et al., *Pancreatic Lkb1 Deletion Leads to Acinar Polarity Defects and Cystic Neoplasms.* Molecular and Cellular Biology, 2008. **28**(7): p. 2414-2425.
138. Pearson, H.B., et al., *Lkb1 Deficiency Causes Prostate Neoplasia in the Mouse.* Cancer Research, 2008. **68**(7): p. 2223-2232.
139. Kamath, R.S. and J. Ahringer, *Genome-wide RNAi screening in Caenorhabditis elegans.* Methods, 2003. **30**(4): p. 313-321.
140. Hammond, S.M., et al., *An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells.* Nature, 2000. **404**(6775): p. 293-6.
141. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans.* Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
142. Kennerdell, J.R. and R.W. Carthew, *Heritable gene silencing in Drosophila using double-stranded RNA.* Nat Biotechnol, 2000. **18**(8): p. 896-8.
143. Tabara, H., A. Grishok, and C.C. Mello, *RNAi in C. elegans: soaking in the genome sequence.* Science, 1998. **282**(5388): p. 430-1.
144. Timmons, L. and A. Fire, *Specific interference by ingested dsRNA.* Nature, 1998. **395**(6705): p. 854.

145. Kamath, R.S., et al., *Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol*, 2001. **2**(1): p. RESEARCH0002.
146. Ohmachi, M., Arur, S., Nayak, S., Schedl, T., *rskn-1, a C. elegans homolog of p90 ribosomal S6 kinases, acts downstream of MPK-1 ERK signaling in germline development*, in *Int. Worm Meeting*. 2005.
147. Frodin, M. and S. Gammeltoft, *Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction*. *Mol Cell Endocrinol*, 1999. **151**(1-2): p. 65-77.
148. Lackner, M.R., et al., *A MAP kinase homolog, mpk-1, is involved in ras-mediated induction of vulval cell fates in Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*, 1994. **8**(2): p. 160-73.
149. Wu, Y. and M. Han, *Suppression of activated Let-60 ras protein defines a role of Caenorhabditis elegans Sur-1 MAP kinase in vulval differentiation*. *Genes Dev*, 1994. **8**(2): p. 147-59.
150. Spilker, A.C., et al., *MAP kinase signaling antagonizes PAR-1 function during polarization of the early Caenorhabditis elegans embryo*. *Genetics*, 2009. **183**(3): p. 965-77.
151. Richardson, J.M., et al., *Cloning, expression and characterisation of FKB-6, the sole large TPR-containing immunophilin from C. elegans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **360**(3): p. 566-72.
152. Prodromou, C., et al., *Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones*. Vol. 18. 1999. 754-762.
153. Carrello, A., et al., *The Common Tetratricopeptide Repeat Acceptor Site for Steroid Receptor-associated Immunophilins and Hop Is Located in the Dimerization Domain of Hsp90*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(5): p. 2682-2689.
154. Young, J.C., W.M.J. Obermann, and F.U. Hartl, *Specific Binding of Tetratricopeptide Repeat Proteins to the C-terminal 12-kDa Domain of hsp90*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(29): p. 18007-18010.
155. Kang, C.B., et al., *FKBP Family Proteins: Immunophilins with Versatile Biological Functions*. *Neurosignals*, 2008. **16**(4): p. 318-325.
156. Ballou, L.M. and R.Z. Lin, *Rapamycin and mTOR kinase inhibitors*. *Journal of Chemical Biology*, 2008. **1**(1-4): p. 27-36.
157. Vowels, J.J. and J.H. Thomas, *Multiple chemosensory defects in daf-11 and daf-21 mutants of Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1994. **138**(2): p. 303-16.
158. Rual, J.-F., et al., *Toward Improving Caenorhabditis elegans Phenome Mapping With an ORFeome-Based RNAi Library*. *Genome Research*, 2004. **14**(10b): p. 2162-2168.
159. Fievet, B.T., et al., *Systematic genetic interaction screens uncover cell polarity regulators and functional redundancy*. *Nat Cell Biol*, 2013. **15**(1): p. 103-12.
160. Mahoney, T.R., et al., *Intestinal signaling to GABAergic neurons regulates a rhythmic behavior in Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(42): p. 16350-16355.
161. Croll, N.A. and J.M. Smith, *Integrated behaviour in the feeding phase of Caenorhabditis elegans (Nematoda)*. *Journal of Zoology*, 1978. **184**(4): p. 507-517.
162. Liu, D.W. and J.H. Thomas, *Regulation of a periodic motor program in C. elegans*. *J Neurosci*, 1994. **14**(4): p. 1953-62.
163. Avery, L. and J.H. Thomas, *Feeding and Defecation*, in *C. elegans II*, D.L. Riddle, et al., Editors. 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY).
164. Thomas, J.H., *Genetic analysis of defecation in Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1990. **124**(4): p. 855-72.

165. McIntire, S.L., et al., *The GABAergic nervous system of Caenorhabditis elegans*. Nature, 1993. **364**(6435): p. 337-341.
166. Iwasaki, K., et al., *aex-3 encodes a novel regulator of presynaptic activity in C. elegans*. Neuron, 1997. **18**(4): p. 613-22.
167. Mahoney, T.R., et al., *Regulation of Synaptic Transmission by RAB-3 and RAB-27 in Caenorhabditis elegans*. Molecular Biology of the Cell, 2006. **17**(6): p. 2617-2625.
168. Doi, M. and K. Iwasaki, *Regulation of retrograde signaling at neuromuscular junctions by the novel C2 domain protein AEX-1*. Neuron, 2002. **33**(2): p. 249-59.
169. Nonet, M.L., *AEXpulsing a retrograde signal*. Neuron, 2002. **33**(2): p. 155-6.
170. Banerjee, A., et al., *SNAP-25 Is Required for a Late Postdocking Step in Ca²⁺-dependent Exocytosis*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(34): p. 20227-20230.
171. Oyler, G.A., et al., *The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations*. The Journal of Cell Biology, 1989. **109**(6): p. 3039-3052.
172. McMahon, H.T., et al., *Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function*. Cell, 1995. **83**(1): p. 111-9.
173. Sollner, T., et al., *SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion*. Nature, 1993. **362**(6418): p. 318-324.
174. Rovere, C., et al., *The RGD motif and the C-terminal segment of proprotein convertase 1 are critical for its cellular trafficking but not for its intracellular binding to integrin alpha5beta1*. J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12461-7.
175. Zhong, M., et al., *Functional analysis of human PACE4-A and PACE4-C isoforms: identification of a new PACE4-CS isoform*. FEBS Letters, 1996. **396**(1): p. 31-36.
176. Eder, J., M. Rheinnecker, and A.R. Fersht, *Folding of Subtilisin BPN': Role of the Pro-sequence*. Journal of Molecular Biology, 1993. **233**(2): p. 293-304.
177. Gluschankof, P. and R.S. Fuller, *A C-terminal domain conserved in precursor processing proteases is required for intramolecular N-terminal maturation of pro-Kex2 protease*. The EMBO Journal, 1994. **13**(10): p. 2280-2288.
178. Devi, L., *Consensus sequence for processing of peptide precursors at monobasic sites*. FEBS Letters, 1991. **280**(2): p. 189-194.
179. Rholam, M., et al., *Role of amino acid sequences flanking dibasic cleavage sites in precursor proteolytic processing. The importance of the first residue C-terminal of the cleavage site*. Eur J Biochem, 1995. **227**(3): p. 707-14.
180. Thomas, G., et al., *Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells*. Science, 1988. **241**(4862): p. 226-30.
181. Mizuno, K., et al., *Yeast KEX2 genes encodes an endopeptidase homologous to subtilisin-like serine proteases*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **156**(1): p. 246-54.
182. Seidah, N.G., et al., *The Subtilisin/Kexin Family of Precursor Convertases: Emphasis on PC1, PC2/7B2, POMC and the Novel Enzyme SKI-1*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1999. **885**(1): p. 57-74.
183. Malide, D., et al., *Electron microscopic immunocytochemical evidence for the involvement of the convertases PC1 and PC2 in the processing of proinsulin in pancreatic beta-cells*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1995. **43**(1): p. 11-9.
184. De Bie, I., et al., *The isoforms of proprotein convertase PC5 are sorted to different subcellular compartments*. The Journal of Cell Biology, 1996. **135**(5): p. 1261-1275.

185. Hatsuzawa, K., K. Murakami, and K. Nakayama, *Molecular and enzymatic properties of furin, a Kex2-like endoprotease involved in precursor cleavage at Arg-X-Lys/Arg-Arg sites*. J Biochem, 1992. **111**(3): p. 296-301.
186. Seidah, N.G. and M. Chrétien, *Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins*. Current Opinion in Biotechnology, 1997. **8**(5): p. 602-607.
187. Thacker, C. and A.M. Rose, *A look at the Caenorhabditis elegans Kex2/Subtilisin-like proprotein convertase family*. Bioessays, 2000. **22**(6): p. 545-53.
188. Nakayama, K., *Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins*. Biochem J, 1997. **327 (Pt 3)**: p. 625-35.
189. Nathoo, A.N., et al., *Identification of neuropeptide-like protein gene families in Caenorhabditis elegans and other species*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(24): p. 14000-14005.
190. Dohmen, R.J., et al., *The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(16): p. 7351-7355.
191. Crowe, E. and E.P.M. Candido, *Characterization of C. elegans RING finger protein 1, a binding partner of ubiquitin-conjugating enzyme 1*. Developmental Biology, 2004. **265**(2): p. 446-459.
192. Pickart, C.M. and M.J. Eddins, *Ubiquitin: structures, functions, mechanisms*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2004. **1695**(1-3): p. 55-72.
193. Kerscher, O., R. Felberbaum, and M. Hochstrasser, *Modification of Proteins by Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2006. **22**(1): p. 159-180.
194. Komander, D. and M. Rape, *The Ubiquitin Code*. Annual Review of Biochemistry, 2012. **81**(1): p. 203-229.
195. Berndsen, C.E. and C. Wolberger, *New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism*. Nat Struct Mol Biol, 2014. **21**(4): p. 301-307.
196. Holway, A.H., C. Hung, and W.M. Michael, *Systematic, RNA-interference-mediated identification of mus-101 modifier genes in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2005. **169**(3): p. 1451-60.
197. Piekny, A.J. and M. Glotzer, *Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis*. Curr Biol, 2008. **18**(1): p. 30-6.
198. Kinoshita, M., et al., *Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins*. Dev Cell, 2002. **3**(6): p. 791-802.
199. Field, C.M. and B.M. Alberts, *Anillin, a contractile ring protein that cycles from the nucleus to the cell cortex*. J Cell Biol, 1995. **131**(1): p. 165-78.
200. Oegema, K., et al., *Functional Analysis of a Human Homologue of the Drosophila Actin Binding Protein Anillin Suggests a Role in Cytokinesis*. The Journal of Cell Biology, 2000. **150**(3): p. 539-552.
201. Straight, A.F., C.M. Field, and T.J. Mitchison, *Anillin binds nonmuscle myosin II and regulates the contractile ring*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(1): p. 193-201.
202. Maddox, A.S., et al., *Distinct roles for two C. elegans anillins in the gonad and early embryo*. Development, 2005. **132**(12): p. 2837-48.
203. Tse, Y.C., A. Piekny, and M. Glotzer, *Anillin promotes astral microtubule-directed cortical myosin polarization*. Molecular Biology of the Cell, 2011. **22**(17): p. 3165-3175.
204. Benkemoun, L., et al., *PAR-4/LKB1 regulates DNA replication during asynchronous division of the early C. elegans embryo*. J Cell Biol, 2014. **205**(4): p. 447-55.

205. Kempthues, K.J. and S. Strome, *Fertilization and Establishment of Polarity in the Embryo*, in *C. elegans II*, D.L. Riddle, et al., Editors. 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY).
206. Noatynska, A., et al., *Coordinating cell polarity and cell cycle progression: what can we learn from flies and worms?* Open Biol, 2013. **3**(8): p. 130083.
207. Griffin, E.E., D.J. Odde, and G. Seydoux, *Regulation of the MEX-5 gradient by a spatially segregated kinase/phosphatase cycle*. Cell, 2011. **146**(6): p. 955-68.
208. Edgar, L.G. and J.D. McGhee, *DNA synthesis and the control of embryonic gene expression in C. elegans*. Cell, 1988. **53**(4): p. 589-99.
209. Saka, Y. and M. Yanagida, *Fission yeast cut5+, required for S phase onset and M phase restraint, is identical to the radiation-damage repair gene rad4+*. Cell, 1993. **74**(2): p. 383-93.
210. Araki, H., et al., *Dpb11, which interacts with DNA polymerase II(epsilon) in Saccharomyces cerevisiae, has a dual role in S-phase progression and at a cell cycle checkpoint*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11791-5.
211. Makiniemi, M., et al., *BRCT domain-containing protein TopBP1 functions in DNA replication and damage response*. J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 30399-406.
212. Gaggioli, V., et al., *CDK phosphorylation of SLD-2 is required for replication initiation and germline development in C. elegans*. J Cell Biol, 2014. **204**(4): p. 507-22.
213. Waga, S. and B. Stillman, *Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 modulates the DNA primer-template recognition complex*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 4177-87.
214. Essers, J., et al., *Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9350-9.
215. Meister, P., et al., *Replication foci dynamics: replication patterns are modulated by S-phase checkpoint kinases in fission yeast*. Embo j, 2007. **26**(5): p. 1315-26.
216. Maddox, P.S., et al., *Molecular analysis of mitotic chromosome condensation using a quantitative time-resolved fluorescence microscopy assay*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(41): p. 15097-102.
217. Encalada, S.E., et al., *DNA replication defects delay cell division and disrupt cell polarity in early Caenorhabditis elegans embryos*. Dev Biol, 2000. **228**(2): p. 225-38.
218. Diffley, J.F., *Quality control in the initiation of eukaryotic DNA replication*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2011. **366**(1584): p. 3545-53.
219. Mantiero, D., et al., *Limiting replication initiation factors execute the temporal programme of origin firing in budding yeast*. Embo j, 2011. **30**(23): p. 4805-14.
220. Tanaka, S., et al., *Origin association of Sld3, Sld7, and Cdc45 proteins is a key step for determination of origin-firing timing*. Curr Biol, 2011. **21**(24): p. 2055-63.
221. Goldstein, B. and I.G. Macara, *The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization*. Dev Cell, 2007. **13**(5): p. 609-22.
222. Hawley, S., et al., *Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade*. Journal of Biology, 2003. **2**(4): p. 1-16.
223. Gan, B., et al., *Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells*. Nature, 2010. **468**(7324): p. 701-4.
224. Nakada, D., T.L. Saunders, and S.J. Morrison, *Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells*. Nature, 2010. **468**(7324): p. 653-8.
225. Brenner, S., *The genetics of Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1974. **77**(1): p. 71-94.
226. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.

227. Notredame, C., D.G. Higgins, and J. Heringa, *T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment*. *J Mol Biol*, 2000. **302**(1): p. 205-17.
228. Wallace, I.M., et al., *M-Coffee: combining multiple sequence alignment methods with T-Coffee*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(6): p. 1692-9.
229. Darriba, D., et al., *ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution*. *Bioinformatics*, 2011. **27**(8): p. 1164-1165.
230. Le, S.Q. and O. Gascuel, *An Improved General Amino Acid Replacement Matrix*. *Molecular Biology and Evolution*, 2008. **25**(7): p. 1307-1320.
231. Whelan, S. and N. Goldman, *A General Empirical Model of Protein Evolution Derived from Multiple Protein Families Using a Maximum-Likelihood Approach*. *Molecular Biology and Evolution*, 2001. **18**(5): p. 691-699.
232. Guindon, S., et al., *New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0*. *Systematic Biology*, 2010. **59**(3): p. 307-321.
233. Yem, A.W., et al., *The Hsp56 component of steroid receptor complexes binds to immobilized FK506 and shows homology to FKBP-12 and FKBP-13*. *Journal of Biological Chemistry*, 1992. **267**(5): p. 2868-2871.
234. Kwon, Y.T., et al., *Female lethality and apoptosis of spermatocytes in mice lacking the UBR2 ubiquitin ligase of the N-end rule pathway*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(22): p. 8255-71.
235. Rousselet, E., et al., *Proprotein Convertase PC7 Enhances the Activation of the EGF Receptor Pathway through Processing of the EGF Precursor*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011. **286**(11): p. 9185-9195.
236. Dumollard, R., et al., *Mos limits the number of meiotic divisions in urochordate eggs*. *Development*, 2011. **138**(5): p. 885-895.
237. Hara, M., et al., *Start of the embryonic cell cycle is dually locked in unfertilized starfish eggs*. *Development*, 2009. **136**(10): p. 1687-1696.
238. Tachibana, K., et al., *Initiation of DNA replication after fertilization is regulated by p90Rsk at pre-RC/pre-IC transition in starfish eggs*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. **107**(11): p. 5006-5011.
239. Zhang, W.L., et al., *Inactivation of MAPK in mature oocytes triggers progression into mitosis via a Ca²⁺-dependent pathway but without completion of S phase*. *Journal of Cell Science*, 2006. **119**(17): p. 3491-3501.
240. Guillemot, J., et al., *Implication of the proprotein convertases in iron homeostasis: Proprotein convertase 7 sheds human transferrin receptor 1 and furin activates hepcidin*. *Hepatology*, 2013. **57**(6): p. 2514-2524.
241. Seidah, N.G., et al., *cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. **93**(8): p. 3388-3393.
242. Moehle, C.M., et al., *Protease B of the lysosomelike vacuole of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is homologous to the subtilisin family of serine proteases*. *Mol Cell Biol*, 1987. **7**(12): p. 4390-9.
243. Zubenko, G.S. and E.W. Jones, *Protein degradation, meiosis and sporulation in proteinase-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae**. *Genetics*, 1981. **97**(1): p. 45-64.
244. Sterky, F., et al., *The sequence of a 30 kb fragment on the left arm of chromosome XV from *Saccharomyces cerevisiae* reveals 15 open reading frames, five of which correspond to previously identified genes*. *Yeast*, 1996. **12**(10B Suppl): p. 1091-5.

245. Hontz, R.D., et al., *Genetic identification of factors that modulate ribosomal DNA transcription in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2009. **182**(1): p. 105-19.
246. Diaz-Balzac, C.A., et al., *Complex cooperative functions of heparan sulfate proteoglycans shape nervous system development in Caenorhabditis elegans*. G3 (Bethesda), 2014. **4**(10): p. 1859-70.
247. Seidah, N.G., *What lies ahead for the proprotein convertases?* Ann N Y Acad Sci, 2011. **1220**: p. 149-61.
248. Xu, X. and B.E. Vogel, *A new job for ancient extracellular matrix proteins: Hemicentins stabilize cleavage furrows*. Commun Integr Biol, 2011. **4**(4): p. 433-5.
249. Tornero, P., V. Conejero, and P. Vera, *Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants*. J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 14412-9.
250. Cinnamon, Y., et al., *Cellular Contractility Requires Ubiquitin Mediated Proteolysis*. PLoS ONE, 2009. **4**(7): p. e6155.
251. Sonnevile, R. and P. Gönczy, *zyg-11 and cul-2 regulate progression through meiosis*. Development, 2004. **131**(15): p. 3527-3543.
252. Hao, Y., L. Boyd, and G. Seydoux, *Stabilization of Cell Polarity by the C. elegans RING Protein PAR-2*. Developmental Cell, 2006. **10**(2): p. 199-208.
253. Morton, D.G., W.A. Hoose, and K.J. Kemphues, *A genome-wide RNAi screen for enhancers of par mutants reveals new contributors to early embryonic polarity in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2012. **192**(3): p. 929-42.
254. McCloskey, R.J. and K.J. Kemphues, *Deubiquitylation Machinery Is Required for Embryonic Polarity in Caenorhabditis elegans*. PLoS Genet, 2012. **8**(11): p. e1003092.
255. Farooqui, S., et al., *Coordinated Lumen Contraction and Expansion during Vulval Tube Morphogenesis in Caenorhabditis elegans*. Developmental Cell, 2012. **23**(3): p. 494-506.
256. Shaw, R.J., et al., *The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling*. Cancer Cell, 2004. **6**(1): p. 91-9.