

Université de Montréal

Régulation de la division asymétrique chez *C. elegans*

par

Alexia Rabilotta

Programmes de biologie moléculaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en biologie moléculaire

Juillet 2015

© Alexia Rabilotta, 2015

Résumé

La division asymétrique est essentielle pour générer la diversité au cours du développement et permet aussi de réguler la balance entre renouvellement et différenciation des cellules souches chez l'adulte. Dans ces deux cas de figure, elle dépend respectivement d'une polarité intrinsèque ou d'une polarité extrinsèque. *C. elegans* est un excellent modèle pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires de la division asymétrique *in vivo*. Chez l'embryon, le maintien d'un axe de polarité antéro-postérieur dépend des protéines PAR conservées et localisées de façon asymétrique en deux groupes mutuellement exclusifs; le groupe antérieur avec PAR-3, PAR-6, PKC-3 et le groupe postérieur avec PAR-2 et PAR-1. L'absence d'une protéine PAR entraîne une perte de polarité et une létalité embryonnaire. Lors d'un crible par ARN interférence mené par Jean-Claude Labbé pour identifier les suppresseurs de la létalité associée à la perte de PAR-2, deux cyclines de type B, CYB-2.1 et CYB-2.2 ont été trouvées. J'ai déterminé que CYB-2.1 et CYB-2.2 interviennent dans la polarité sans perturber le cycle cellulaire et agissent vraisemblablement avec leur kinase associée, CDK-1, pour stabiliser les niveaux protéiques de PAR-6. Ces travaux permettent de mieux définir les liens étroits entre polarité et cycle cellulaire.

La lignée germinale de *C. elegans* est un excellent modèle pour étudier les divisions des cellules souches germinales *in vivo*. Par contre, l'absence d'orientation préférentielle de ces divisions laisse envisager que la complexité morphologique de la niche pourrait engendrer une diversité d'axe possible. J'ai étudié la régulation morphologique de cette niche, une unique cellule somatique appelée distal tip cell (DTC), qui arborise de longues extensions au stade adulte. Mes résultats préliminaires favorisent un modèle dans lequel les cellules souches et progéniteurs germinaux (CSPG) supportent la formation de ces extensions. Enfin, j'ai obtenu des conditions favorables à l'étude de la division asymétrique extrinsèque dans ce modèle, en simplifiant l'architecture de la niche dans des conditions qui préservent les divisions cellulaires des cellules souches.

Mes travaux ont permis de mieux comprendre les liens unissant les différents processus biologiques impliqués dans la division asymétrique, d'une part par l'étude du rôle qu'y jouent des régulateurs clés du cycle cellulaire au cours du développement et d'autre part par la

caractérisation d'une communication bidirectionnelle entre la niche et les cellules souches chez l'adulte.

Mots-clés : division asymétrique, polarité, cycline B, CDK-1, PAR, cellule souche germinale, niche, DTC, GLP-1, Notch, *C. elegans*.

Abstract

Asymmetric cell division is essential to generate cell diversity during development and for maintaining a proper balance between self-renewal and differentiation in adult stem cells. In the first case it is mostly dependent on intrinsic polarity and in the second case on extrinsic polarity cues. *C. elegans* is an excellent model to study the cellular and molecular mechanisms of asymmetric division *in vivo*. In the embryo, the establishment and maintenance of an antero-posterior axis of polarity depends on conserved PAR proteins that are themselves localized asymmetrically in two mutually exclusive groups; the anterior complex with PAR-3, PAR-6, PKC-3 and the posterior group with PAR-2 and PAR-1. The absence of any PAR protein causes a loss of polarity and subsequent embryonic lethality. A genome wide RNAi screen performed by Jean-Claude Labbé identified *cyb-2.1* and *cyb-2.2*, encoding for two B-type cyclins, as suppressors of *par-2* lethality. I found that CYB-2.1 and CYB-2.2 intervene in polarity with their associated kinase CDK-1 but without affecting cell cycle progression, by regulating PAR-6 levels. This work further helped deciphering the complex links that exist between the regulation of cell cycle and cell polarity.

The *C. elegans* germline is an excellent model for studying stem cell divisions *in vivo*. However, contrary to what is observed in other model systems, *C. elegans* germline stem cells do not show an obvious preferential orientation for their self-renewal divisions, perhaps because the complex niche architecture could offer multiple possible axis. Indeed, the *C. elegans* germline niche is a single somatic cell, called the distal tip cell (DTC) that extends multiple processes in contact with germ stem and progenitor cells (GSPCs) at adulthood. While addressing the regulation of the niche morphology, I found that GSPCs could support the formation of the DTC processes. I also identify conditions that greatly simplify the niche morphology allowing future investigations of mitotic germ cell division toward a unique DTC process.

My work helped decipher the links between different bio-cellular processes implicated in asymmetric cell division both by the determination of the role played by key cell cycle regulators in embryonic polarity and by the characterization of a bi-directional communication between the niche and the GSPC at adulthood.

Keywords : asymmetric division, polarity, cyclin B, CDK-1, PAR, germline stem cell, niche, DTC, Notch, GLP-1, *C. elegans*

Table des matières

Contents

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xx
But et plan de la thèse.....	xxi
CHAPITRE 1.....	1
1. Introduction.....	1
1.1. Mécanisme de la division asymétrique intrinsèque.....	2
1.1.1. Division asymétrique intrinsèque : les principaux modèles.....	3
1.1.2. Établissement et maintien de la polarité chez le zygote de <i>C. elegans</i>	7
1.1.2.1. Avantages du modèle de <i>C. elegans</i>	7
1.1.2.2. Perte de symétrie du zygote.....	8
1.1.2.3. Établissement et maintien de la polarité.....	10
1.1.3. Identité et régulation des protéines PAR conservées.....	16
1.1.3.1. Régulation PAR phosphorylation.....	17
1.1.3.2. Régulation PAR interactions protéiques.....	18
1.1.3.3. Régulation PAR liaison au cortex.....	19
1.1.4. Contrôle de la division asymétrique par dégradation des déterminants et régulateurs de la polarité.....	21
1.1.4.1. La dégradation protéique.....	21
1.1.4.2. Les complexes culline régulent la dégradation des déterminants cellulaires.....	22
1.1.4.3. La polarité peut être régulée par dégradation des protéines PAR.....	24
1.2. Liens entre cycle cellulaire et polarité cellulaire.....	26
1.2.1. Le cycle cellulaire chez <i>C. elegans</i>	26

1.2.2.	Le complexe cycline B/Cdk1 lors de l'entrée en phase M	29
1.2.3.	Les principaux évènements du cycle cellulaire méiotique précédant l'établissement de la polarité chez le zygote.....	33
1.2.4.	Les évènements du cycle cellulaire sont couplés aux évènements de la polarité chez <i>C. elegans</i>	34
1.2.4.1.	L'interphase	34
1.2.4.2.	La phase M.....	36
1.2.5.	Les régulateurs mitotiques peuvent directement réguler la polarité.	38
1.2.6.	Des défauts du cycle cellulaire peuvent indirectement affecter la polarité chez <i>C. elegans</i>	41
1.3.	Premier objectif de recherche	44
1.4.	Division asymétrique extrinsèque.....	45
1.4.1.	Division asymétrique extrinsèque : les principaux modèles.....	47
1.4.1.1.	La lignée germinale femelle de la Drosophile	47
1.4.1.2.	La lignée germinale mâle de la Drosophile	48
1.4.2.	La lignée germinale de <i>C. elegans</i>	51
1.4.2.1.	Formation de la lignée germinale et de la gonade somatique.....	51
1.4.2.2.	Interactions entre la niche et les cellules souches au cours du développement	56
1.4.3.	Deuxième objectif de recherche.....	60
1.4.4.	La voie Notch comme principal régulateur du maintien des CSPG par la niche chez <i>C. elegans</i>	62
1.4.4.1.	Rôles généraux de la voie Notch chez différents organismes.....	62
1.4.4.2.	Les composants de la voie Notch sont conservés chez <i>C. elegans</i>	64
1.4.4.3.	Les aspects spécifiques de la voie Notch chez <i>C. elegans</i>	67
1.4.4.4.	Les cibles de Notch dans la régulation des CSGs.....	69
1.4.4.5.	Les principales voies de signalisation en aval de Notch dans la décision mitose/méiose	71
1.4.5.	L'interaction Notch/Delta comme mécanisme d'adhésion cellulaire.....	76
1.4.6.	Les caractéristiques morphologiques de la niche au cours du développement.	77
1.4.6.1.	La DTC est une cellule migratoire durant les stades larvaires.....	77

1.4.6.2. La DTC est une cellule tentaculaire chez l'adulte	79
1.5. Implication de la polarité, de la division asymétrique et de la régulation de la niche dans les pathologies	81
1.5.1. La division asymétrique et la polarité intrinsèque comme gardiens de l'homéostasie tissulaire.....	81
1.5.2. Les différentes facettes de relation niche/cellule souche et ses liens avec le cancer	83
1.6. Objectifs de la thèse	85
CHAPITRE 2	86
2. CDK-1 and two B-type cyclins promote PAR-6 stabilization during polarization of the early <i>C. elegans</i> embryo	86
2.1. Contribution des co-auteurs	87
2.2. Abstract	88
2.3. Introduction.....	89
2.4. Materials and Methods.....	92
2.4.1. Strains and alleles	92
2.4.2. Quantitative RT-PCR analysis	92
2.4.3. Lethality suppression assays.....	93
2.4.4. Time-lapse microscopy.....	94
2.4.5. Immunofluorescence.....	94
2.4.6. Western blot analyses	95
2.5. Results.....	96
2.5.1. <i>cyb-2.1</i> and <i>cyb-2.2</i> are suppressors of <i>par-2(it5ts)</i> lethality and polarity defects	96
2.5.2. CYB-2.1 and CYB-2.2 function with CDK-1 in embryonic polarity.....	97
2.5.3. CYB-2.1 and CYB-2.2 regulate anterior PAR protein localization.....	98
2.5.4. CYB-2.1 and CYB-2.2 regulate polarity independently of cell cycle progression.....	98
2.5.5. CYB-2.1/2 and CDK-1 regulate PAR-6 levels through the Cullin CUL-2, but independently of NOS-3	100
2.6. Discussion.....	102

2.7.	Acknowledgements.....	105
2.8.	Figures.....	106
CHAPITRE 3.....		120
3.	Germline stem/progenitor cells regulate their niche morphology through the Notch receptor in <i>C. elegans</i>	120
3.1.	Contribution des co-auteurs	121
3.2.	Abstract.....	122
3.3.	Introduction.....	123
3.4.	Material and Methods	125
3.4.1.	Strains and alleles	125
3.4.2.	Visualization and analysis of DTC and gonad morphology in live animals... ..	125
3.4.3.	Visualization of immunostainings and Phalloidin stainings in fixed animals	126
3.4.4.	Immunofluorescence and Phalloidin staining.....	127
3.4.5.	RNAi treatment.....	127
3.5.	Results and discussion	129
3.5.1.	The DTC processes are microtubule-rich structures.....	129
3.5.2.	Formation but not maintenance of DTC processes is influenced by GSPC state	130
3.5.3.	An intact GLP-1/Notch receptor is important but not essential for the formation of DTC processes.....	131
3.5.4.	Deficient DTC migration in males and in VAB-3 mutants correlates with changes in the niche morphology	132
3.6.	Conclusion	135
3.7.	Acknowledgements.....	136
3.8.	Figures.....	137
CHAPITRE 4.....		146
4.	Discussion.....	146
4.1.	Des régulateurs communs couplent le cycle cellulaire à la polarité durant la division asymétrique.....	147
4.1.1.	CYB-2.1/2/CDK-1 forme-t-il un complexe régulant spécifiquement la polarité chez l'embryon?.....	147

4.1.2.	Le mécanisme de régulation des niveaux de PAR-6 par CYB-2.1/2/CDK-1 : des études chez <i>C. elegans</i> et la Drosophile ouvrent des pistes de compréhension	148
4.1.3.	Limites expérimentales	152
4.2.	La communication niche/cellules souches est bidirectionnelle chez <i>C. elegans</i>	154
4.2.1.	Repenser la division asymétrique dans la lignée germinale de <i>C. elegans</i>	154
4.2.2.	Comment GLP-1 participe-t-il à la formation des extensions au stade adulte? 157	
4.2.2.1.	L'expression de GLP-1 par les CSPG, plutôt que leur destin cellulaire, est importante pour la maturation de la niche	157
4.2.2.2.	La morphologie de la niche sous contrôle de l'activité de la voie Notch? .	159
4.2.2.3.	Un rôle non canonique de Notch dans la morphologie de la niche?.....	160
4.2.3.	Comment la formation des extensions est-elle initiée au cours du développement?	162
4.2.3.1.	L'arrêt de la migration de la DTC, une condition à la croissance de ses extensions?.....	163
4.2.3.2.	Quels rôles pour l'élongation de la gonade dans la formation des extensions? 164	
4.3.	Perspectives.....	167
	Bibliographie.....	171
	Annexe 1	I
	Article	I
	MAP kinase signaling antagonizes PAR-1 function during polarization of the early <i>Caenorhabditis elegans</i> embryo.	I
	Contribution des co-auteurs	II

Liste des figures

Figure 1.1 Représentation schématique d'une division asymétrique (ou symétrique) intrinsèque.	2
Figure 1.2 Représentation schématique des principaux modèles d'étude de la division asymétrique intrinsèque.	5
Figure 1.3 Perte de symétrie chez le zygote de <i>C. elegans</i>	10
Figure 1.4 Les régulateurs du positionnement asymétrique du fuseau mitotique chez le zygote de <i>C. elegans</i>	14
Figure 1.5 Modèle pour l'établissement et le maintien de la polarité chez <i>C. elegans</i>	16
Figure 1.6 Nature moléculaire des protéines PAR.	20
Figure 1.7 Les phases du cycle cellulaire.	29
Figure 1.8 Modèle général d'activation des complexes cycline /CDK.	32
Figure 1.9 Les régulateurs du cycle cellulaire impliqués dans la polarité chez la <i>Drosophile</i> et <i>C. elegans</i>	40
Figure 1.10 Modèle d'initiation d'une polarité corticale par le fuseau méiotique du zygote de <i>C. elegans</i>	43
Figure 1.11 Représentation schématique d'une division asymétrique ou symétrique régulée par des facteurs extrinsèques.	46
Figure 1.12 Division asymétrique extrinsèque chez les lignées germinales femelle et mâle de la <i>Drosophile</i>	50
Figure 1.13 Formation de la lignée germinale chez <i>C. elegans</i>	51
Figure 1.14 Représentation schématique du développement de la gonade somatique et germinale aux stades larvaires et adulte.	54
Figure 1.16 Modèle de formation des tumeurs proximales.	58
Figure 1.17 Représentation schématique soulignant la maturation morphologique de la niche.	61
Figure 1.18 Nature moléculaire des récepteurs Notch et de leur ligand de la famille DSL.	65
Figure 1.19 Schématisation de la voie Notch chez <i>C. elegans</i>	67

Figure 1.20 Régulation de la décision mitose/méiose en aval de la voie Notch.....	75
Figure 2.1 : Schematic representation of PAR protein-dependent polarity establishment and maintenance during <i>C. elegans</i> early embryogenesis.....	106
Figure 2.2 (Figure S1): Quantitative transcriptional analysis at the <i>cyb-2.1</i> and <i>cyb-2.2</i> loci in wild-type and <i>cyb-2.1/2</i> double mutant animals.	108
Figure 2.3 Depletion of <i>cyb-2.1</i> and <i>cyb-2.2</i> suppresses the lethality and polarity defects associated with the loss of <i>par-2</i>.....	110
Figure 2.4 Mutation in the cyclin B-associated kinase CDK-1 suppresses <i>par-2</i>(RNAi) lethality and polarity defects.....	112
Figure 2.5 CYB-2.1/2 affect anterior PAR protein localization in the 1-cell embryo.....	113
Figure 2.6 (Figure S2) CYB-2.1/2 do not regulate the timing or velocity of acto-myosin-dependent cortical flows.....	114
Figure 2.7 (Figure S3) Cell cycle durations and polarity-related phenotypes in <i>cyb-2.1/2</i> and <i>cdk-1</i> mutant embryos.....	115
Figure 2.8 (Figure S4) Depletion of CYB-1 does not restore embryonic polarity in <i>par-2</i> mutants.....	116
Figure 2.9 CYB-2.1/2 and CDK-1 regulate PAR-6 levels in the early embryo.....	117
Figure 2.10 (Figure S5) Analysis of PAR-6 levels in various embryonic extracts.....	118
Figure 2.11 CYB-2.1/2 act with the Cullin CUL-2 but independently of NOS-3 in the embryonic polarity pathway.....	119
Figure 3.1 The DTC processes are microtubule-dependent structures.....	137
Figure 3.2 The DTC processes are stable structures which proper formation relies on GSPCs.....	138
Figure 3.3 The DTC morphology is regulated by GLP-1 independently of germ cell state.....	140
Figure 3.4 GLP-1 localization defects correlate with niche morphology defects in <i>glp-1</i> mutants.....	141
Figure 3.5 (Figure S1) The DTC processes growth is independent of the germ cells sexual identity or the DTC position in the worm.....	142
Figure 3.6 The DTC migration could prevent the processes growth.....	144

Figure 3.7 VAB-3 could regulate the DTC maturation independently of its control on the DTC migration. 145

Liste des abréviations

ABa	Cellule AB antérieure
ABp	Cellule AB postérieure
AC	<i>Anchor cell</i>
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIR-1	<i>Aurora/Ipl1 related kinase</i>
ANK	<i>Ankyrin repeats</i>
A/P	<i>Anterior/Posterior</i>
APC	<i>Anaphase-promoting complex</i> (dans le texte, APC et APC-4)
Apc2	<i>Adenomatous polyposis coli protein</i>
APH	<i>Anterior pharynx defective protein</i> (dans le texte, APH-1,-2)
APX-1	<i>Anterior pharynx in excess protein</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATR	<i>ATM and Rad3-related protein</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
CAK	<i>Cdk-activating kinase</i>
CACN-1	<i>Cactin homolog</i>
Cactin	<i>Cactus interacting protein</i>
CB	Cystoblaste
CBC	Complexe composé de l'Elongin C, l'Elongin B et CUL-2
CC	Cellules de la coiffe (<i>Cap cell</i>)
CCDC-55	<i>Coiled coil domain containing homolog</i>
CDC	<i>Cell division control protein</i> (dans le texte, CDC-42 et Cdc24)
CDC	<i>Cell division cycle protein</i> (dans le texte, CDC-25, CDC-37 et Cdc20)
CDK	<i>Cyclin-dependant kinase</i> (dans le texte, CDK-1,-2,-4,-6)
CED-10	<i>Cell death abnormality protein</i>
CEH-22	<i>C. elegans homeobox protein</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>

CHK-1	<i>Checkpoint kinase</i>
CKI	<i>CDK inhibitor</i>
Cks	<i>Cyclin-dependent kinase subunit</i>
CR1	<i>Conserved region 1</i>
CRIB	<i>CDC42/Rac-interactive binding protein</i>
CRL	Complexe culline RING ligase
CSGs	Cellules souches germinales
CSL	CBF, Su(H), LAG-1
CSPG	Cellules souches et progéniteurs germinaux (GSPCs en anglais)
CUL	Homologue de la culline (dans le texte, CUL-1,-2,-3)
CYB	Homologues des cyclines B (dans le texte, CYB-1,-2.1,-2.2,-3)
CYE-1	Homologue de la cycline E
CYK-4	<i>Cytokinesis defect protein</i>
CySC	<i>Cyst stem cell</i>
DC	Cyste en développement
DIC	<i>Differential interference contrast</i>
DSL	<i>Delta, Serrate, LAG-2 family of Notch ligands</i>
DTC	<i>Distal tip cell</i>
DU	<i>Dorsal uterine precursor</i>
E1	<i>Ubiquitine activating enzyme</i>
E2	<i>Ubiquitine conjugating enzyme</i>
E3	<i>Ubiquitine-protein ligase</i>
ECT-2	<i>Epithelial cell transforming sequence 2 oncogene homolog</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMB	<i>Abnormal embryogenesis</i>
EPN-1	<i>Epsin homolog</i>
EsC	<i>Escort stem cells</i>
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
FBF	<i>Fem-3 mRNA binding factor</i> (dans le texte, FBF-1,-2)
FEM	<i>Feminization of XX and XO animals</i> (dans le texte FEM-1,-2,-3)
FOG	<i>Feminization of germline</i> (dans le texte FOG-1,-3)

G1	<i>Growth/Gap phase 1</i>
G2	<i>Growth/Gap phase 2</i>
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GB	<i>Gonioblaste</i>
GDI	<i>Guanine dissociation inhibitor</i>
GDP	<i>Guanine diphosphate</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GLD	<i>Defective in germline proliferation</i> (dans le texte GLD-1,-2,-3,-4)
GLP-1	<i>Abnormal germ line proliferation</i>
GMC	<i>Ganglion mother cell</i>
GOA-1	<i>G protein O, alpha subunit</i>
GON-1	<i>Abnormal gonad development protein</i>
GPA-16	<i>G protein, alpha subunit</i>
GPR	<i>G protein regulator</i> (dans le texte GPR-1,-2)
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase</i>
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i>
GTPase	<i>GTP hydrolase</i>
H2B	<i>Histone H2B</i>
HD	<i>Heterodimerization domain</i>
HECT	<i>Homologous to E6-AP carboxy terminus</i>
HER-1	<i>Hermaphrodization of XO animals protein</i>
Hes	<i>Hairy and enhancer of split protein</i>
Hey	<i>Hairy/E(spl)-related with YRPW motif protein</i>
Hh	<i>Hedgehog</i>
HLH-2	<i>Helix loop helix protein</i>
HOP-1	<i>Homolog of presenilin protein</i>
INA-1	<i>Integrin alpha</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
kDa	<i>Kilo Dalton</i>
KIN-19	<i>Protéine kinase</i>

LAG	<i>lin-12 and glp-1 phenotype</i> (dans le texte LAG-1,-2)
LEP	<i>Long external processes</i>
LET-99	<i>Lethal protein</i> (dans le texte LET-99, -502)
LGL-1	<i>Lethal giant larvae homolog</i>
LIN-5	<i>Abnormal cell lineage</i> (dans le texte LIN-5, -12)
LNR	<i>LIN-12/Notch repeats</i>
LIP-1	<i>Lateral signal induced phosphatase</i>
LST-1	<i>Lateral signaling target</i>
MAP Kinase	<i>Mitogene activated protein kinase</i>
MAT	<i>Metaphase-to-anaphase transition defect</i> (dans le texte MAT-1,-2,-3)
MBK-2	<i>Minibrain kinase</i>
MEC	Matrice extra-cellulaire
MEX	<i>Muscle excess protein</i> (dans le texte, MEX-1,-5,-6)
MIG	<i>Abnormal cell migration protein</i> (dans le texte, MIG-2-,6)
MNNL	<i>Module at the N-terminus of Notch Ligands</i>
MTOC	<i>Microtubules organization center</i>
Myt1	<i>Membrane-associated tyrosine and threonine specific cdc2-inhibitory kinase 1</i>
MYC	Oncogène homologue au virus de la myélocytomatose aviaire v-myc
NECD	<i>Notch extra-cellular domain</i>
NICD	<i>Notch intra-cellular domain</i>
MLC-4	<i>Myosin light chain</i>
nm	nanomètre
NMY-2	<i>Non-muscle myosin</i>
nN	nanoNewton
NOS-3	<i>Nanos related protein</i>
NRR	<i>Negative Regulatory Region</i>
OMA	<i>Oocyte maturation defective</i> (dans le texte, OMA-1,-2)
PAR	<i>Partition defective protein</i> (dans le texte, PAR-1,-2,-3,-4,-5,-6)
PAT	<i>Paralysed arrest at two-fold</i> (dans le texte, PAT-2,-3)
Pax6	<i>Paired box domain protein</i>
PB1	<i>Phagocyte oxidase/Bem1 protein</i>

PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDZ	<i>PSD-95, Discs large, Zona occludens-1</i>
PEST	Séquence riche en acides aminés P, E, S, T
PEN-2	<i>Presenilin enhancer protein</i>
PGS	Précurseurs de la lignée germinale somatique
phase M	phase mitotique
phase S	phase de synthèse d'ADN
PIE-1	<i>Pharynx and intestine in excess protein</i>
PKC-3	<i>Protein Kinase C</i>
PLK-1	<i>Polo-like kinase</i>
PON	<i>Partner of Numb</i>
POS-1	<i>Posterior segregation protein</i>
PP2A	<i>Protein phosphatase 2A</i>
PUF	<i>Pumilio and FBF family protein</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RAC	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i> (dans le texte, RAC-2 et Rac)
RAM	<i>Regulatory of amino acid metabolism domain</i>
RBX-1	<i>Ring-box protein</i>
RGA	<i>Rho GTPase activating protein</i> (dans le texte, RGA-3,-4)
RHO-1	<i>Ras homolog gene family member</i>
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RNAi	<i>Ribonucleic acid interference</i>
SC	<i>Somatic cell</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCF	<i>Skp1-Cullin-F-box protein</i>
SEL-12	<i>Suppressor/Enhancer of lin-12 protein</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
Sh	<i>Sheath cell</i> (dans le texte, Sh-1,-2,-3,-4,-5)
SIP	<i>Short internal processes</i>
Skp1	<i>S-phase kinase associated protein 1</i>

SKR	<i>Skp1 related</i> (dans le texte, SKR-1,-2)
SPAT-1	<i>Suppressor of par-2 lethality</i>
SOP	<i>Sensory organ progenitor cell</i>
SP	Spectrosome
SPD	<i>Spindle defective</i> (dans le texte, SPD-5,-2)
SS	<i>Spermatheca and Sheath precursor</i>
StAR	<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SYGL-1	<i>Synthetic germline proliferation defective</i>
TAD	<i>Transactivation domain</i>
TAF-4	<i>TBP-associated transcription factor family</i>
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TF	<i>Terminal Filament</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
TM	Transmembranaire
TRA	<i>Transformer of XX animals into males</i>
UBA-1	<i>Ubiquitin associated domain protein</i>
UBC	<i>Ubiquitin conjugating enzyme</i>
μL	microlitre
UNC	<i>Uncoordinated</i> (dans le texte, UNC-5,-6,-40)
VAB-3	<i>Variable abnormal morphology</i>
VU	<i>Ventral uterine precursor</i>
Wnt	<i>Wingless-type MMTV integration site family</i>
ZIF-1	<i>Zinc Finger-interacting protein</i>
ZYG-11	<i>Zygote defective protein</i>

Ce que nous observons, ce n'est pas la Nature en soi, mais la Nature exposée à notre méthode d'investigation.

Heisenberg

Si j'avais une heure pour sauver le monde, je passerai 59 minutes à définir le problème et une minute à trouver des solutions.

Einstein

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier mon directeur de recherche, Jean-Claude Labbé, un dur au cœur tendre, toujours présent pour ses étudiants, se préoccupant de notre réussite et ne comptant pas son temps pour former la relève scientifique de demain. Je suis particulièrement impressionnée par la juste balance entre la grande liberté qu'il laisse à notre soif de découvertes et le soutien sensé qu'il nous apporte quotidiennement. Malgré le nombre de pages d'introduction que contient cette thèse, l'une des choses les plus précieuses que Jean-Claude m'ait apprises est à écrire de façon claire et concise mes travaux de recherches. En plus d'être un scientifique de haut calibre, Jean-Claude a aussi du flair pour choisir des étudiants motivés et humainement sympathiques comme coéquipiers (ères) de laboratoire. Cela m'a permis d'avoir du plaisir en travaillant, d'allier discussions scientifiques et débats politiques jusqu'aux petites heures du matin, notamment avec deux Français aux accents charmants; Nico et Vincent, une Colombienne aux déhanchements entraînants; Paulina, une Iranienne à la cuisine délicieuse; Rana, plusieurs Indiens à la culture enrichissante; Ramraj, Jayshree et Forum, un Chinois à la dent sucré; Ken, une Américaine socialiste; Abby et plusieurs Québécois bons vivants; Catherine, Eugénie, Marianne et Patrick. Je voudrais aussi remercier les membres des laboratoires de Paul et Amy Maddox, ainsi que Christian Charbonneau de la plateforme de microscopie, qui fut d'une aide précieuse et d'une patience exemplaire. Enfin, je remercie spécialement celui avec qui j'explore le monde du microscopique à l'IRIC jusqu'aux étendues sauvages de la Corse et du Québec depuis plus d'une décennie; mon cher Carl Maflamme. Il est un scientifique rigoureux et passionné, un papa fantastique et un copain au sens de l'humour à te faire oublier n'importe quel résultat négatif du lab. Merci à mes parents ainsi qu'à celle qui a écourté mes nuits, mais allongé le bonheur de mes journées, ma petite Alia : avec toi une thèse c'est deux fois plus long, mais 100 fois plus amusant! Je termine cette section avec une pensée spéciale pour mes deux amies, Valérie et Sara, deux femmes brillantes envers lesquelles je chéris une admiration et une affection intemporelle, les meilleurs partent toujours les premiers...

But et plan de la thèse

Le but général de cette thèse est d'apporter de nouvelles connaissances sur certains aspects plus controversés ou moins bien caractérisés de la division cellulaire asymétrique chez *C. elegans*.

Le chapitre 1 d'introduction définit le concept de division asymétrique et de polarité cellulaire au cours du développement et chez l'adulte. La première section (section 1.1) présente de façon générale certains des principaux modèles d'étude de la division asymétrique intrinsèque et de façon plus détaillée le modèle de l'embryon de *C. elegans* utilisé dans cette thèse. Les protéines PARs, principaux régulateurs conservés de la division asymétrique, sont ensuite introduites. Dans le but de comprendre le contexte global du premier projet de recherche, qui porte sur le rôle de deux cyclines B dans la division asymétrique, les liens étroits entre cycle cellulaire et polarité cellulaire sont ensuite présentés (section 1.2). Ce contexte montre qu'il est difficile de séparer la contribution des régulateurs mitotiques dans le cycle cellulaire et dans la polarité. La section 1.4 décrit ensuite les mécanismes de polarité extrinsèques mis en place par le microenvironnement d'une cellule, notamment dans le cas de la division asymétrique extrinsèque des cellules souches par rapport à leur niche. Les principaux modèles d'étude de cette relation niche/cellules souches sont présentés puis le cas spécifique de la lignée germinale de *C. elegans* est ensuite discuté. Dans le but de comprendre comment cette communication niche/cellules souches est modulée au cours du développement dans ce modèle, ce qui constitue le second objectif général de cette thèse, l'emphasis est ensuite mise sur la régulation morphologique de la niche qui change au cours du développement. Pour contextualiser l'importance de l'ensemble de ces recherches dans le traitement des maladies, les conséquences de la perte de polarité en lien avec des situations pathologiques sont abordées en fin d'introduction, dans la section 1.5.

Le chapitre 2 présente la caractérisation de deux cyclines de type B, CYB-2.1 et CYB-2.2, comme régulateurs de la division asymétrique dépendante des protéines PAR chez l'embryon de *C. elegans*. Les résultats présentés montrent que ces deux cyclines interviennent dans la polarité sans perturber le cycle cellulaire, en stabilisant les niveaux protéiques de PAR-6, un

rôle partagé par leur kinase associée CDK-1. Cette étude, dont je suis la première auteure, a été publiée dans le journal *Plos One* en 2015.

Le chapitre 3 relate mes recherches en cours sur la caractérisation des changements morphologiques que subie la niche des cellules souches germinales de *C. elegans*, appelée *distal tip cell* (DTC), au cours du développement. J'ai trouvé que les cellules souches germinales peuvent influencer la morphologie de leur niche d'une façon dépendante du récepteur Notch. Ces travaux établissent aussi des conditions favorables à l'étude de la division asymétrique dans ce modèle, en permettant de simplifier l'architecture de la niche. Cette étude, dont je suis la première auteure, montre plusieurs résultats préliminaires qui devront être validés avant publication.

Le chapitre 4 se compose d'une discussion sur les résultats et la méthode expérimentale exposés dans les chapitres 2 et 3 et propose des hypothèses à tester pour la continuation de chacun des projets. La section Perspectives de ce chapitre aborde des questions à plus large spectre, apportant une vision globale sur la contribution de ces deux projets au domaine de la division asymétrique.

CHAPITRE 1

1. Introduction

1.1. Mécanisme de la division asymétrique intrinsèque.

La plupart des eucaryotes multicellulaires possèdent une variété de types cellulaires qui dérivent tous d'une même cellule, le zygote formé après fécondation. Chez l'adulte, certaines cellules, appelées cellules souches, doivent soutenir la production de plusieurs types de descendants, comme c'est le cas pour les cellules sanguines qui sont continuellement remplacées au cours de la vie d'un individu. Pour générer une telle diversité cellulaire au cours du développement et maintenir l'homéostasie au sein de l'organisme formé, certaines cellules utilisent un mode de division inégal : la division asymétrique. Ce type de division permet de former, à partir d'une cellule mère, deux cellules filles différentes en devenir. Elle peut dépendre de la répartition polarisée de déterminants cellulaires au sein de cellule mère en division ou de l'interaction polarisée de cette cellule mère avec son environnement cellulaire, lequel est appelé niche. Le premier mécanisme, prédominant au cours du développement, est appelé division asymétrique intrinsèque puisqu'il dépend de facteurs inhérents à la cellule mère. Le deuxième mécanisme est nommé division asymétrique extrinsèque et est utilisé par les cellules souches adultes pour réguler leur balance entre autorenouveau et différenciation.

La première partie de cette thèse s'intéresse aux mécanismes de la division asymétrique intrinsèque alors que la deuxième partie abordera la relation niche/cellule souche qui est déterminante pour la régulation de la division asymétrique extrinsèque.

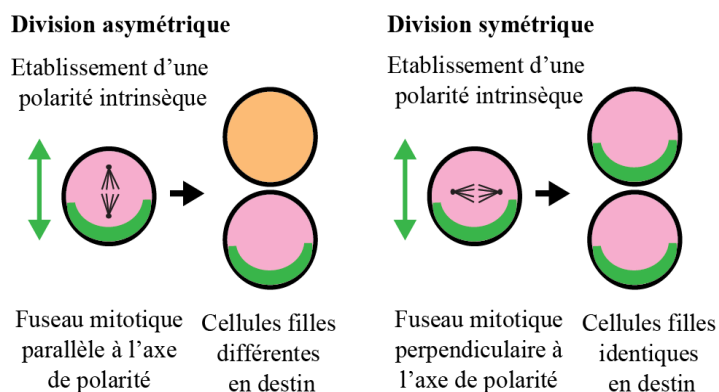


Figure 1.1 Représentation schématique d'une division asymétrique (ou symétrique) intrinsèque.

La division asymétrique intrinsèque nécessite l'établissement d'une polarité intrinsèque et la régulation du positionnement du fuseau mitotique durant la division. Les déterminants cellulaires polarisés sont représentés par un croissant vert et l'axe de polarité par une double flèche verte. Les différents destins cellulaires sont représentés par les couleurs rose ou orange.

La division asymétrique intrinsèque, prédominante au cours du développement, nécessite que les protéines et molécules d'ARN qui confèrent des identités distinctes aux deux cellules filles soient polarisées chez la cellule mère et que le positionnement du fuseau mitotique lors de la division soit parallèle à l'axe de polarité (Figure 1.1). L'hypothèse du rôle de la polarité intrinsèque dans l'attribution de l'identité cellulaire a été postulée il y a plus d'un siècle par Conklin, qui utilisa l'œuf fertilisé de l'ascidie *Styela partita* comme modèle. Cet œuf est composé de différents domaines pigmentés et Conklin suivit leur distribution au cours du développement. Il remarqua que les cellules héritant du cytoplasme jaune se différenciaient toujours en muscles, montrant que la répartition cytoplasmique inégale d'un déterminant cellulaire peut induire un destin spécifique chez la cellule fille qui en hérite (Conklin, 1905). Cependant, ce n'est que récemment que les bases moléculaires de ce type de division ont commencé à être caractérisées chez la Drosophile et chez *C. elegans*. Les modèles cellulaires de division asymétrique chez la Drosophile seront abordés superficiellement dans la section suivante puis le modèle utilisé pour cette thèse, soit l'embryon de *C. elegans*, sera décrit en plus amples détails.

1.1.1. Division asymétrique intrinsèque : les principaux modèles

La protéine membranaire Numb, répresseur de la voie Notch, a été le premier régulateur de la division asymétrique à être caractérisé comme un déterminant lui-même polarisé au cortex antérieur de la cellule SOP (Sensory Organ Progenitor cells) chez la Drosophile. Cette cellule est un précurseur neuronal qui utilise des signaux extrinsèques, tels que la signalisation Notch, couplés à un mécanisme de localisation intrinsèque des déterminants cellulaires pour définir l'identité des futures cellules filles (François, 2015). Suite à la division asymétrique dans l'axe antéro-postérieur, lequel est défini par la polarité planaire du tissu, une cellule postérieure pIIa, qui hérite du signal Notch, et une cellule antérieure pIIb, qui hérite de Numb, sont formées (Gho and Schweisguth, 1998; Rhyu et al., 1994). pIIa se divise pour générer une cellule soie (*shaft cell*) et une cellule socle (*socket cell*) alors que pIIb produit pIIIb et une cellule gliale qui se divise encore une fois pour générer un neurone et une cellule gaine (*sheath cell*). Chez les mutants Numb, Notch est actif dans les deux cellules filles et pIIb adopte le destin de pIIa. À l'inverse, l'expression de Numb dans les deux cellules filles promeut l'adoption du destin pIIb par celles-ci et la formation de deux neurones et deux

cellules gaine (Rhyu et al., 1994). La localisation de Numb au cortex antérieur est donc essentielle à l'identité des futures cellules filles et nécessite l'action antagoniste des protéines PAR, Bazooka (Par3) et Par6, qui forment un complexe avec aPKC au cortex postérieur (Bellaïche et al., 2001; Schober et al., 1999) (Figure 1.2).

L'établissement d'une polarité corticale similaire existe chez un deuxième précurseur neuronal de la Drosophile; le neuroblaste, considéré comme une cellule souche du cerveau de la mouche en développement. Par une division asymétrique suivant un axe apico-basal, le neuroblaste assure son autorenouveau et donne naissance à une plus petite cellule, appelée la Ganglion Mother Cell (GMC) qui est un précurseur des neurones (Prehoda, 2009). Bien que le neuroblaste hérite des protéines PAR suite à sa délamination du neuro-épithélium polarisé dont il dérive, la localisation apicale de celles-ci est perdue après division. Or le neuroblaste larvaire peut soutenir la production de milliers de neurones, impliquant que la polarité est rétablie par un mécanisme intrinsèque à chaque division (Ito and Hotta, 1992; Siegrist and Doe, 2005). Les déterminants cellulaires localisés au pôle basal du neuroblaste en division agissent ensemble pour spécifier l'identité de la GMC et existent en deux complexes. L'un inclut Prospero, un facteur de transcription induisant la différenciation neuronale, Brat, une protéine suppresseur de tumeur, son adaptateur Miranda ainsi que la protéine liant l'ARN Staufén alors que l'autre est formé de Numb et son partenaire Pon (Betschinger et al., 2006; Choksi et al., 2006; Knoblich et al., 1995). Tout comme chez la cellule SOP, les protéines PAR régissent la localisation de ces déterminants cellulaires pour les restreindre au pôle opposé (Petronczki and Knoblich, 2001; Wirtz-Peitz et al., 2008; Wodarz et al., 2000) (Figure 1.2).

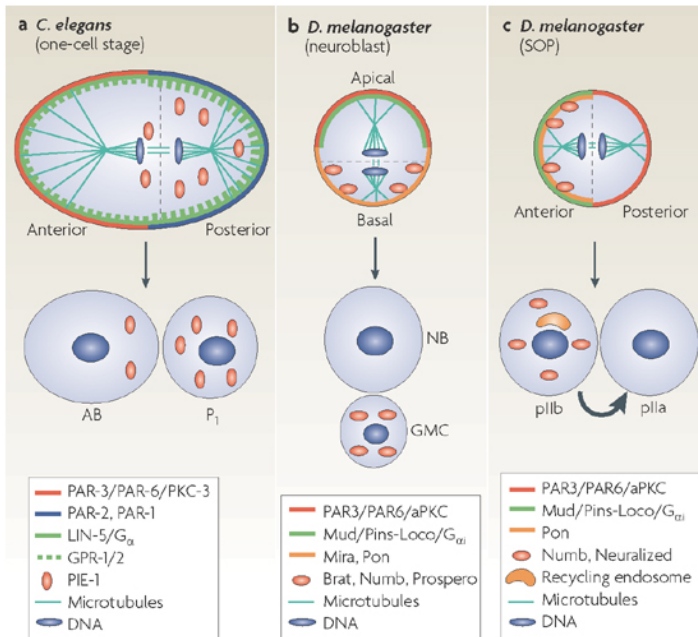


Figure 1.2 Représentation schématique des principaux modèles d'étude de la division asymétrique intrinsèque.

L'axe de polarité est antéro-postérieur chez l'embryon de *C. elegans* (a) ainsi que dans la cellule SOP (b) et apico-basal chez le neuroblaste de la Drosophile (c). Les protéines PAR conservées (représentées par une ligne corticale rouge ou bleue) sont localisées asymétriquement et permettent la polarisation des déterminants cellulaires (représentés par des cercles rouges) au sein de la cellule en division. Figure recopiée avec permission, provenant de (Gonczy, 2008).

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

La première division embryonnaire chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) est elle aussi hautement asymétrique et dépend de l'établissement d'un axe de polarité antéro-postérieur qui se fait de façon complètement intrinsèque. Suite à la division mitotique du zygote unicellulaire P0, deux cellules filles différentes en taille et en destin sont générées; un grand blastomère somatique nommée AB à l'antérieur et un petit blastomère germinale nommée P1 au postérieur (Figure 1.2). La deuxième division est aussi asymétrique et asynchrone, avec AB se divisant environ 2 minutes avant P1. Au sein de la lignée P (précurseur de la lignée germinale), P1 poursuit une série de trois autres divisions asymétriques menant chaque fois à la formation d'un blastomère précurseur de la lignée germinale (séquentiellement nommé P2, P3 puis P4) et une cellule somatique. Cinq divisions asymétriques permettront de former les six cellules fondatrices à l'origine des lignées somatiques et germinales du futur individu, soit AB, MS, E, C, D, et P4 (Sulston et al., 1983). Ainsi, AB donnera naissance à la plupart de l'ectoderme alors que P1 générera tout l'endoderme et la lignée germinale.

L'embryon de *C. elegans* établit sa polarité antéro-postérieure suite à la complétion de la méiose maternelle avec le centrosome du spermatozoïde apportant l'élément clé qui brise la symétrie du zygote (Cowan and Hyman, 2004; Goldstein and Hird, 1996; O'Connell et al., 2000; Wallenfang and Seydoux, 2000). Les protéines PAR, découvertes chez *C. elegans*, sont les principaux régulateurs de la division asymétrique dans ce modèle. PAR-1, PAR-2, PAR-3, PAR-4, PAR-5 et PAR-6 ainsi que PKC-3, l'homologue de la protéine kinase C atypique aPKC, la protéine « Lethal giant larvae » LGL-1, et la petite GTPase CDC-42 permettent la polarisation du zygote avant la première division (Beatty et al., 2010; Gotta et al., 2001; Hoegge et al., 2010; Kempfues et al., 1988; Tabuse et al., 1998). Tout comme chez la Drosophile, la plupart des protéines PAR adoptent une localisation corticale asymétrique qui permet la polarisation des déterminants cellulaires cytoplasmiques et spécifie l'identité des deux cellules filles.

Les divisions asymétriques chez la Drosophile et *C. elegans* présentent donc des similarités indiquant que leurs mécanismes de contrôle fondamentaux sont conservés. Ces modèles partagent plusieurs régulateurs communs tels que les protéines PAR, elles-mêmes distribuées de façon asymétrique au cortex, notamment via leur interaction avec la petite GTPase CDC-42 (Aceto et al., 2006; Atwood et al., 2007; Gotta et al., 2001). Certains de ces régulateurs utilisent les microtubules asexés pour s'établir à leur domaine cortical (Moteji et al., 2011; Siegrist and Doe, 2005), puis restreignent la localisation d'autres régulateurs au pôle opposé par phosphorylation (Hao et al., 2006; Suzuki and Ohno, 2006). Le positionnement du fuseau mitotique dans l'axe de polarité permet la ségrégation asymétrique des déterminants cellulaires au sein des deux cellules filles. Ce fuseau est très asymétrique chez le neuroblaste et chez l'embryon de *C. elegans*, contribuant à la formation de deux cellules filles de tailles différentes, mais est central dans le modèle SOP (Albertson, 1984; Kaltschmidt et al., 2000; Roegiers et al., 2001). Ces différences peuvent s'expliquer par les différentes interactions des protéines PAR avec les complexes protéiques liant les microtubules impliqués dans la genèse des forces appliquées sur le fuseau (Neumuller and Knoblich, 2009).

Enfin, dans ces trois modèles, la polarisation de la cellule mère est mise en place à des moments précis du cycle cellulaire, suggérant que certains régulateurs mitotiques pourraient initier des événements clés dans l'établissement de la polarité. Les liens unissant le cycle

cellulaire et la polarité, chez *C. elegans* comme dans d'autres organismes, sont multiples et d'autant plus intéressants que ces deux processus biologiques sont souvent dérégulés dans les cancers. Le premier objectif de cette thèse est justement d'adresser le rôle spécifique de régulateurs du cycle cellulaire dans la division asymétrique en utilisant l'embryon de *C. elegans* comme modèle.

1.1.2. Établissement et maintien de la polarité chez le zygote de *C. elegans*

1.1.2.1. Avantages du modèle de *C. elegans*

C. elegans est un excellent modèle pour étudier les mécanismes de la division asymétrique en laboratoire : son développement est rapide (3 jours à 20°C pour passer du stade embryonnaire au stade adulte) et est couplé à une grande capacité reproductive (300 progénitures par individu). L'identification de la lignée cellulaire de chaque cellule chez l'embryon par Sulston et ses collègues il y a plus de 30 ans a montré qu'elle est invariante. Une différence dans le stéréotype de chacune des divisions peut donc être considérée comme un phénotype engendré par les conditions expérimentales particulières (Sulston et al., 1983). Ces travaux ont permis de connaître le destin et la position anatomique de chaque cellule, un avantage qui, combiné à la transparence des embryons et des adultes, permet par exemple de regarder la localisation d'une protéine fluorescente en temps réel, au sein d'un organisme vivant et au cours du développement. *C. elegans* fut aussi le premier animal à avoir son génome complètement séquencé et de façon concomitante, l'utilisation d'ARN interférent fut montrée comme un moyen efficace de diminuer les niveaux d'une protéine dans cet organisme (Consortium, 1998; Fire et al., 1998). Puisque les ARNm de l'embryon précoce sont hérités de sa mère, le rôle de potentiels régulateurs de la division asymétrique peut être adressé chez le zygote par l'administration d'ARN interférent chez les larves ou les adultes (Edgar et al., 1994; Seydoux and Fire, 1994). Des banques de bactéries produisant de l'ARN double brin pour presque l'entièreté du génome de *C. elegans* ont été créées. Il suffit au vers d'ingérer un de ces clones bactériens pour entraîner une diminution des niveaux de transcrits d'un gène

spécifique, ce qui rend facile à réaliser les criblages de perte de fonction pour le génome au complet (Fraser et al., 2000; Kamath et al., 2003; Timmons and Fire, 1998). Enfin, les principaux événements menant à l'établissement et au maintien d'un axe de polarité antéro-postérieur chez le zygote sont hautement reproductibles et peuvent être visualisés en temps réel par microscopie à contraste interférentiel (Albertson, 1984; Gönczy et al., 1999b). Contrairement aux autres modèles d'étude de la division asymétrique intrinsèque qui sont partiellement soumis à l'influence d'une polarité extrinsèque du tissu dont ils dérivent, l'embryon de *C. elegans* établit un axe de polarité antéro-postérieur lorsqu'il n'est formé que d'une cellule, impliquant que la régulation de sa polarité lui est complètement intrinsèque. Cette affirmation peut toutefois être nuancée puisque l'entrée d'une entité externe, le spermatozoïde, constitue l'élément clé qui brise la symétrie de l'ovocyte.

1.1.2.2. Perte de symétrie du zygote

Les ovocytes de *C. elegans*, bloqués en prophase de méiose I, se développent et grossissent dans la gonade proximale de l'hermaphrodite jusqu'à ce qu'ils entrent dans la spermathèque lors de l'ovulation et y soient fertilisés. Ils ne possèdent pas encore de polarité intrinsèque et l'entrée du spermatozoïde ne l'établit pas tout de suite, même s'il définit généralement le futur pôle postérieur de l'embryon (Albertson, 1984; Goldstein and Hird, 1996). La fertilisation promeut la complétion des deux cycles de méiose maternelle (McNally and McNally, 2005) et engendre des contractions uniformes du cortex d'acto-myosine qui entoure l'embryon dès l'anaphase de la méiose II. Ces contractions dépendent des chaînes lourdes et légères de la myosine II non musculaire, respectivement NMY-2 et MLC-4, de leurs activateurs, la GTPase RHO-1, la Rho kinase LET-502 ainsi que de ECT-2, le facteur d'échange de la GTPase RHO-1 (la GEF de RHO-1) qui promeut l'échange du GDP pour le GTP et active ainsi RHO-1 (Motegi and Sugimoto, 2006; Munro et al., 2004; Shelton et al., 1999). L'utilisation de lignées transgéniques exprimant NMY-2::GFP a révélé que la myosine s'organise en foci, espacés de 2 à 3 μm , et probablement responsables des invaginations locales de la membrane (Munro et al., 2004). ECT-2 est aussi localisé symétriquement à l'ensemble du cortex et active RHO-1 pour permettre la contractilité de l'acto-myosine

(Zonies et al., 2010). Le signe le plus précoce de la perte de symétrie est l'arrêt local des contractions et la disparition des foci de myosine là où le centrosome du spermatozoïde établit un contact rapproché avec le cortex (Bienkowska and Cowan, 2012; Cheeks et al., 2004; Cowan and Hyman, 2004; Cuenca et al., 2003; Hamill et al., 2002). Ces foci s'éloignent ensuite du centrosome paternel en un mouvement radial vers le pôle antérieur et à une vitesse d'environ 5-7 $\mu\text{m}/\text{min}$. L'inactivation de RHO-1 à proximité du centrosome est un évènement clé dans ce processus et fait intervenir un mécanisme indépendant du site d'entrée du spermatozoïde ou de l'ADN paternel (Goldstein and Hird, 1996; Sadler and Shakes, 2000). L'élément essentiel se retrouverait dans le centrosome fourni par le spermatozoïde, puisque son ablation ou la perte de protéines permettant son assemblage/maturation, tel que SPD-2, SPD-5 et CYE-1, entraîne une perte de la polarité du zygote (Cowan and Hyman, 2006; Hamill et al., 2002; O'Connell et al., 2000). CYK-4, la protéine activatrice de la GTPase RHO-1 (la GAP de RHO-1), qui promeut l'hydrolyse du GTP et inactive donc RHO-1, a été proposée comme le facteur apporté par le spermatozoïde permettant d'initier la polarité (Jenkins et al., 2006). Sa localisation près du centrosome et au cortex du zygote, corrèle avec un tel rôle mais des études plus récentes démontrent que CYK-4 est inactif durant la période de polarisation de l'embryon (Tse et al., 2012). Si plusieurs études s'accordent sur l'importance de l'inactivation locale de RHO-1, probablement via la déplétion de sa GEF ECT-2 autour du centrosome, comment ce dernier orchestre le tout n'est toujours pas résolu (Motegi and Sugimoto, 2006; Schonegg and Hyman, 2006). Deux autres GAP de RHO-1, RGA-3 et RGA-4, ont été identifiés comme des régulateurs de la contractilité durant la phase suivante d'établissement de la polarité. Leur co-déplétion augmente la contractilité ce qui a pour effet d'affecter la localisation des protéines PAR, mais elle ne prévient pas la relaxation du cortex d'acto-myosine au pôle postérieur (Schmutz et al., 2007; Schonegg et al., 2007). Enfin, bien que le rôle des microtubules du centrosome dans le bris de la symétrie du zygote ait été sujet de controverses (Cowan and Hyman, 2004; Sonnevile and Gönczy, 2004; Tsai and Ahringer, 2007; Wallenfang and Seydoux, 2000), une récente étude a clairement établi leur importance dans l'initiation de la localisation corticale de PAR-2, indépendamment du cortex d'acto-myosine (Motegi et al., 2011). Ainsi, le centrosome polarise le zygote en apportant le facteur d'inactivation de ECT-2 et en nucléant les microtubules auxquels PAR-2 se lie pour joindre le cortex postérieur (Figure 1.3).

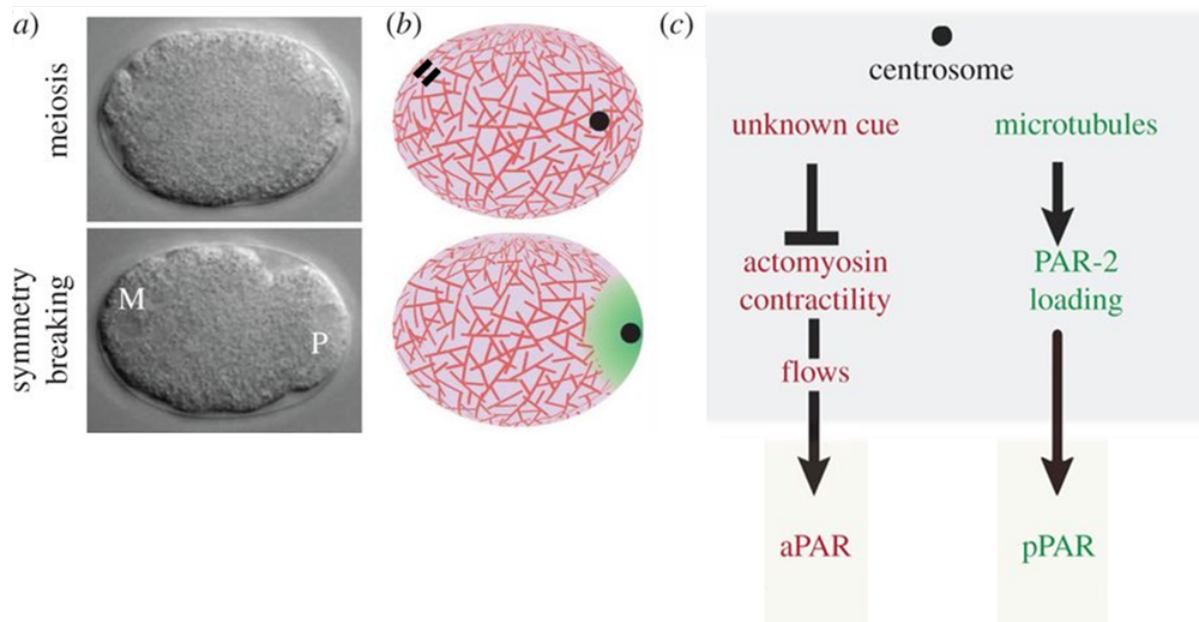


Figure 1.3 Perte de symétrie chez le zygote de *C. elegans*.

(a) Images de microscopie à contraste interférentiel montrant l'embryon unicellulaire durant la méiose puis lors de l'initiation de la polarité (*symmetry breaking*). On y remarque les contractions du cortex d'acto-myosine initiant la polarité. Le pronoyau paternel est désigné par un P et le pronoyau maternel par un M. (b) Représentation schématique de la surface corticale de l'embryon, avec le cortex d'acto-myosine en rouge foncé, les protéines PAR antérieures (aPAR) en rouge pâle et les protéines PAR postérieures (pPAR) en vert. Les centrosomes sont schématisés avec des points noirs et les chromosomes en anaphase méiotiques par des lignes noires parallèles. (c) Diagramme schématisant les deux mécanismes impliqués dans l'initiation de la polarité. Figure adaptée avec permission, provenant de (Motegi and Seydoux, 2013). Lien vers la licence : <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

1.1.2.3. Établissement et maintien de la polarité

Chez *C. elegans*, l'établissement et le maintien de la polarité fait intervenir la localisation asymétrique des protéines PAR. Les six gènes PAR, pour *partition defective*, ont d'abord été identifiés chez *C. elegans* par Kemphues et ses collègues lors de cribles visant à trouver des gènes entraînant une létalité embryonnaire suite à une perte de division asymétrique chez le zygote (Kemphues et al., 1988). Trois groupes de protéines PAR peuvent être distingués sur la base de leur localisation : les protéines PAR antérieures PAR-3, PAR-6,

PKC-3 qui forment un complexe avec la petite GTPase CDC-42 au cortex antérieur de l'embryon unicellulaire, les protéines PAR postérieures avec PAR-1 et PAR-2, qui forment un groupe avec LGL-1 au cortex opposé, et les protéines PAR symétriques, PAR-4 et PAR-5 retrouvées au cortex et au cytoplasme.

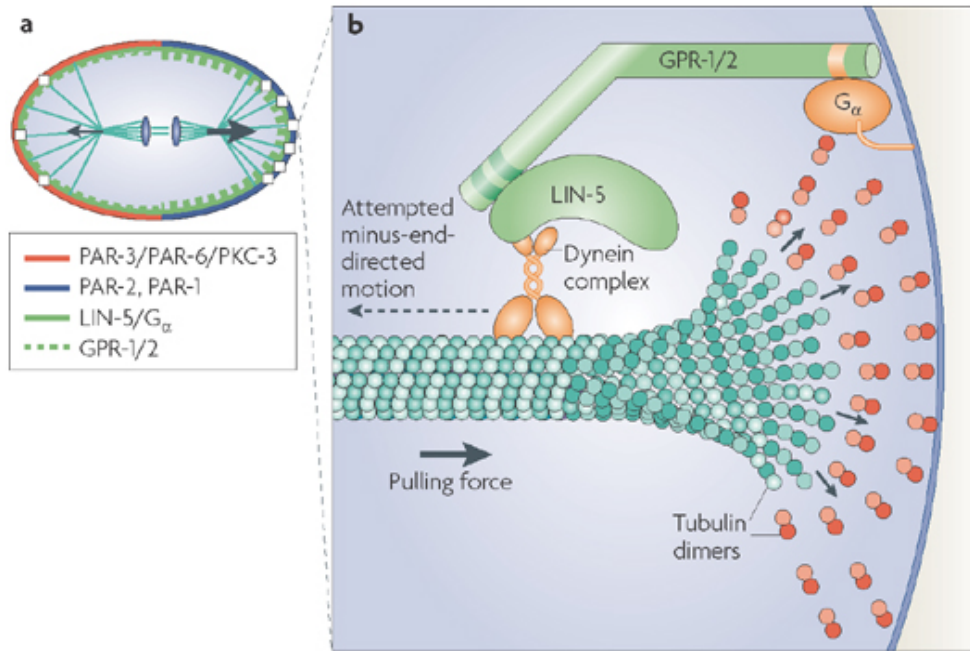
Avant l'initiation de la polarité corticale du zygote, PAR-6, PAR-3, PKC-3 sont localisées symétriquement autour du cortex alors que PAR-2 et PAR-1 sont retrouvées dans le cytoplasme. Quelques secondes après le déplacement initial des foci d'acto-myosine s'éloignant du centrosome, PAR-2 est visualisé au cortex postérieur qui est dépourvu de contractilité, marquant l'initiation de la phase d'établissement de la polarité. Le mouvement des protéines PAR-6, PAR-3 et PKC-3 est concomitant avec celui de l'acto-myosine, suggérant que le complexe antérieur est physiquement lié au cortex contractile et suit son déplacement au pôle antérieur. Le flux contractile rétracte le complexe PAR-6/PAR-3/PKC-3 à la moitié antérieur du cortex, permettant aux protéines PAR-1 et PAR-2 de s'établir au cortex postérieur non contractile (Cuenca et al., 2003; Munro et al., 2004; Strome, 1986). La force mécanique expliquant la directionnalité du flux cortical pourrait être l'anisotropie dans la tension corticale. Celle-ci est uniforme dans l'axe antéro-postérieur, mais est deux fois plus forte au pôle antérieur dans la direction orthogonale à cet axe (Mayer et al., 2010). Dans des situations où le cortex d'acto-myosine est perturbé, la polarité des protéines PAR est elle aussi affectée, suggérant que la contractilité asymétrique du cortex est le mécanisme principal qui gouverne l'établissement de la polarité (Guo and Kemphues, 1996; Hill and Strome, 1988; Severson and Bowerman, 2003; Shelton et al., 1999). Tel que mentionné plus haut, un mécanisme parallèle, dépendant des microtubules, permet de polariser l'embryon en absence de contractilité corticale (dans des embryons mutants pour *ect-2*) même si cette polarisation est retardée et présente des défauts dans localisation précoce des protéines PAR (Motegi et al., 2011; Zonies et al., 2010). Bien que l'initiation de la polarité contractile ne requière pas les protéines PAR, PAR-3, PAR-6 et PKC-3 permettent d'amplifier les contractions, générant une boucle d'autorégulation positive sur la localisation du complexe antérieur (Cheeks et al., 2004; Munro et al., 2004). Durant la phase d'établissement de la polarité, le pronoyau maternel, généralement localisé à l'antérieur, migre vers le pronoyau paternel et les deux pronoyaux se rencontrent au pôle postérieur de l'embryon. Cette migration dépend d'une part des

microtubules astraux et d'autre part du flux cytoplasmique généré en réponse au flux cortical et se déplaçant en direction opposée à celui-ci (Gönczy et al., 1999a; Hird and White, 1993; Strome and Wood, 1983)

Les mutants *par-2* présentent une polarité contractile moins robuste qui est suffisante pour localiser PAR-6 au pôle antérieur durant la phase précoce de polarisation, mais insuffisante pour assister la migration du pronoyau maternel vers le pôle postérieur (Cheeks et al., 2004; Cuenca et al., 2003; Munro et al., 2004). Il en résulte une rencontre central des pronoyaux, un phénotype qui est facilement observable par microscopie à contraste interférentiel. En absence de PAR-2, PAR-6, PAR-3 et PKC-3 se délocalisent lorsque les contractions asymétriques cessent et les protéines PAR antérieures occupent la quasi-totalité du cortex avant la cytokinèse. Cette perte de polarité mène à une létalité embryonnaire (Boyd et al., 1996; Cuenca et al., 2003).

Une fois localisées, les protéines PAR maintiennent leur asymétrie par un antagonisme réciproque entre les groupes antérieurs et postérieurs. Cette exclusion dépend essentiellement des phosphorylations par les kinases PKC-3, PAR-1 et PAR-4 et sera discutée dans la section 1.1.3. (Cuenca et al., 2003; Goehring et al., 2011b; Hill and Strome, 1988; Munro et al., 2004; Zonies et al., 2010). Durant cette phase de maintien de la polarité, les pronoyaux reviennent se positionner au centre de l'embryon et procèdent à une rotation de 90° pour positionner les centrosomes dans l'axe de polarité antéro-postérieur. L'enveloppe nucléaire se brise et le fuseau mitotique se forme, puis se déplace vers le pôle postérieur de façon à générer, après la cytokinèse, une grosse cellule AB antérieure et une petite cellule P1 postérieure (Albertson, 1984). Le positionnement du fuseau dépend de forces de traction corticales appliquées sur les microtubules astraux. Les protéines PAR sont à l'origine du déséquilibre entre les forces antérieures et postérieures appliquées au fuseau mitotique si bien qu'en leur absence, le fuseau reste central, menant à la formation de deux cellules filles de taille égale (Grill et al., 2001; Grill et al., 2003; Labbe et al., 2004). La transmission de la polarité corticale vers le fuseau mitotique passe par l'enrichissement asymétrique des générateurs de forces corticales. Ces derniers forment un complexe ternaire comprenant les protéines $G\alpha$ GOA-1 et GPA-16, enchâssées à l'ensemble de la membrane par leur myristoylation, la protéine à motif superhélice LIN-5 ainsi que GPR-1 et GPR-2 (régulateurs

des protéines G référés ensemble comme GPR-1/2) qui sont enrichies au pôle postérieur en phase M (Colombo et al., 2003; Gotta and Ahringer, 2001; Gotta et al., 2003; Srinivasan et al., 2003; Tsou et al., 2003). GPR-1/2 utilisent leur motif GoLoco pour s'associer à GOA-1 et GPA-16 et agissent comme GDI (inhibiteur de la dissociation du nucléotide guanidique) pour ces deux sous-unités $G\alpha$, permettant leur activation polarisée. LIN-5 fait le lien entre les générateurs de forces corticales et les moteurs des microtubules en liant à la fois la dynéine et GPR-1/2 (Couwenbergs et al., 2007; Kotak et al., 2012; Nguyen-Ngoc et al., 2007; Park and Rose, 2008; Srinivasan et al., 2003). Les forces corticales sont exclues du cortex latéral grâce à la présence de LET-99 le long d'une bande latérale entre les domaines antérieurs et postérieurs des protéines PAR. La localisation corticale de LET-99 dépend de PAR-1 et inhibe le recrutement de GPR-1/2 (Krueger et al., 2010; Park and Rose, 2008; Tsou et al., 2003). Le complexe ternaire LIN-5/GAO-1, GPA-16/GPR-1/2, ancré à la membrane et liant les microtubules via la dynéine, est donc enrichi au pôle postérieur sous l'action des protéines PAR. En combinaison avec la dépolymérisation des microtubules, il permet de déplacer le fuseau mitotique vers ce pôle en mitose (Figure 1.4). Enfin, la phosphorylation de LIN-5 par PKC-3 en pro-métaphase/métaphase pourrait aussi participer à l'inégalité des forces corticales en inhibant le complexe ternaire à l'antérieur. D'abord, PKC-3 phosphoryle LIN-5 sur 4 résidus sérines et cette forme phosphorylée est localisée avec PKC-3 au pôle antérieur. Ensuite, en l'absence de LIN-5 endogène, l'expression d'une forme de LIN-5 phospho-déficiente pour ces 4 résidus sérines entraîne une augmentation des forces de traction vers le pôle antérieur (Galli et al., 2011). La division reste toutefois inégale, contrairement au phénotype engendré par *lin-5* (RNAi), ce qui suggère que ce mécanisme n'est pas prépondérant dans le positionnement du fuseau mitotique.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 1.4 Les régulateurs du positionnement asymétrique du fuseau mitotique chez le zygote de *C. elegans*.

(a) Représentation schématique de l'embryon unicellulaire lors de l'anaphase mitotique avec la localisation des protéines PAR et celle des générateurs de forces corticales. Les carrés blancs représentent les complexes ternaires LIN-5/G α /GPR-1/2 enrichis au pôle postérieur. Les flèches de tailles différentes rendent compte de l'intensité des forces corticales appliquées sur les microtubules à chaque pôle. (b) Grossissement d'une partie du cortex postérieur montrant les interactions protéiques entre le complexe ternaire et la dynéine, permettant la génération des forces corticales. Figure recopiée avec permission, provenant de (Gonczy, 2008).

Les protéines PAR et le positionnement asymétrique du fuseau mitotique assurent une ségrégation polarisée des déterminants cellulaires au sein des deux cellules filles (Figure 1.5). Certains d'entre eux, incluant MEX-5, MEX-6, PIE-1, POS-1 et les granules P, sont localisés asymétriquement dès la première division et agissent comme médiateurs de la polarité en régulant la localisation d'autres déterminants. MEX-5 et MEX-6, référées ensemble comme MEX-5/6, sont deux protéines presque identiques, contenant des domaines à doigt de zinc CCCH en tandem. Elles sont directement en aval des protéines PAR dans la voie de signalisation établissant la polarité du zygote mais affectent aussi la localisation des protéines

PAR en inhibant l'expansion du complexe antérieur vers le postérieur (Cuenca et al., 2003; Schubert et al., 2000; Tenlen et al., 2008) (Figure 1.5). PAR-1 et MEX-5/6 forment des gradients cytoplasmiques complémentaires et la phosphorylation de MEX-5, qui dépend de PAR-1 *in vivo*, régule sa localisation asymétrique (Griffin et al., 2011; Tenlen et al., 2008). Le mécanisme impliqué est indépendant de la dégradation et de la synthèse protéique et fait intervenir une régulation de la mobilité cytoplasmique de MEX-5. Le modèle actuel suggère que la phosphorylation par PAR-1 libère MEX-5 de sa liaison à des complexes protéines-ARN au postérieur de l'embryon, augmentant ainsi sa mobilité spécifiquement à cet endroit. Au pôle antérieur, l'absence de PAR-1 et la déphosphorylation de MEX-5 par la phosphatase PP2A entraînent une diminution de sa mobilité (Daniels et al., 2010; Griffin et al., 2011). MEX-5/6 régule à son tour la localisation de plusieurs déterminants cellulaires incluant PIE-1, POS-1 et MEX-1, tel que discuté dans la section 1.1.4

Les protéines PAR et la ségrégation asymétrique des déterminants cytoplasmiques sont essentiels à l'acquisition d'un destin différent pour les cellules AB et P1. Cette différence se reflète notamment au cours de la seconde division mitotique qui commence environ 2 minutes plus tôt chez AB par rapport à P1 et qui fait intervenir un positionnement des fuseaux mitotiques perpendiculaires l'un par rapport à l'autre (Kemphues and Strome, 1997) (Figure 1.5). L'asynchronie entre les divisions de AB et P1 s'explique par trois mécanismes en aval des protéines PAR. Premièrement, la présence d'un plus grand nombre de fourches de réplication actives dans AB permet à cette cellule de répliquer son ADN en un temps réduit par rapport à P1. Deuxièmement, la présence d'un point de contrôle du cycle cellulaire dans la cellule P1 retarde systématiquement la complétion de la phase S dans celle-ci. Enfin, l'enrichissement des régulateurs positifs du cycle cellulaire dans AB lui permet d'entrer plus rapidement en mitose. Les protéines PAR apparaissent comme des régulateurs clés de ces événements et les mécanismes sous-jacents seront abordés dans la section 1.2 sur le cycle cellulaire.

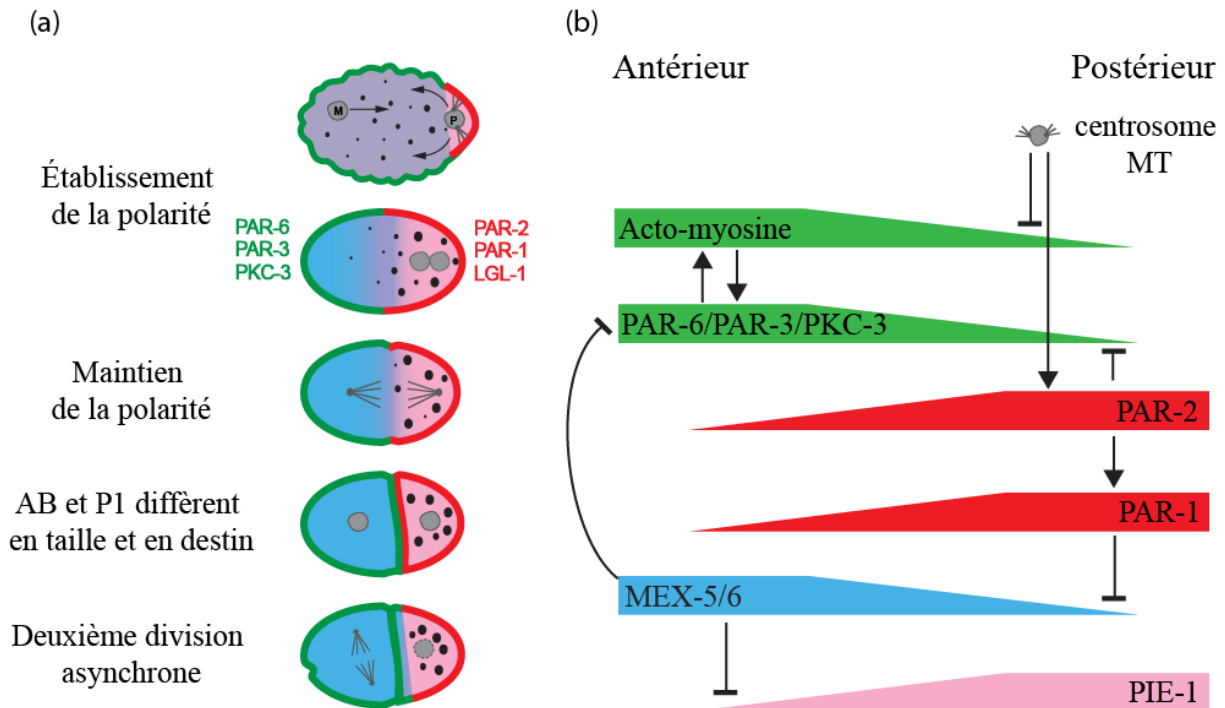


Figure 1.5 Modèle pour l'établissement et le maintien de la polarité chez *C. elegans*.

(a) Représentation schématique de l'embryon durant la première et la deuxième division asymétrique. Les protéines PAR antérieures et le cortex d'acto-myosine sont représentés en vert et les protéines PAR postérieures le sont en rouge. Certains déterminants cytoplasmiques sont aussi montrés, incluant MEX-5/6 en bleu, PIE-1 en rose et les granules P en noir. Les pronoyaux maternel (M) et paternel (P) ainsi que le fuseau mitotique à différents stades sont représentés. L'antérieur est à gauche et le postérieur à droite. Au stade deux cellules, AB est la grande cellule antérieure et P1 est la petite cellule postérieure. (b) Schéma généralisant le modèle de répression séquentiel entre les régulateurs et les déterminants de la polarité qui permet le maintien de leur localisation asymétrique. Les abréviations sont données dans la section abréviations.

1.1.3. Identité et régulation des protéines PAR conservées

Une fois la polarité des protéines PAR établie par la contractilité asymétrique du cortex d'acto-myosine, les protéines PAR antérieures et postérieures maintiennent leur distribution par un mécanisme d'exclusion mutuelle entre les deux groupes (Figure 1.5). Ainsi, la perte de PAR-6, PAR-3 ou PKC-3 entraîne une délocalisation du groupe postérieur vers le pôle antérieur et, de façon réciproque, la perte de PAR-2 engendre la délocalisation du complexe antérieur vers le pôle postérieur. La déplétion d'une des protéines PAR est suffisante pour causer une perte de polarité et de division asymétrique menant à une létalité embryonnaire (Boyd et al., 1996; Cuenca et al., 2003; Tabuse et al., 1998). Au sein du complexe antérieur, la

localisation de PAR-3, PAR-6 et PKC-3 est aussi interdépendante puisque la perte de l'une d'elle entraîne des défauts de localisation chez les autres. PAR-1 est cependant en aval des autres protéines du système puisque sa perte n'affecte pas dramatiquement leur localisation, même si elle engendre une diminution du domaine cortical de PAR-6/PAR-3/PKC-3. Celle-ci est due à l'activité aberrante de MEX-5/6 au postérieur en absence de PAR-1 et met en lumière une boucle de régulation négative des protéines MEX-5/6 sur l'expansion du domaine des protéines PAR antérieures (Cuenca et al., 2003).

Les mécanismes de localisation des protéines PAR sont largement dépendant de leurs identités moléculaires comme le suggèrent plusieurs études *in vitro* et *in vivo* effectuées chez différentes espèces tels que la levure (pour Cdc42), la Drosophile, et les mammifères chez qui le rôle et l'asymétrie des protéines PAR et/ou de CDC-42 est conservé au sein de différents types cellulaires. Cdc42 est le régulateur clé de l'établissement de la polarité qui définit le site de bourgeonnement chez *S. cerevisiae* (Adams et al., 1990; Slaughter et al., 2009). Il agit de concert avec Par6, Par3 et aPKC dans l'établissement de la polarité du neuroblaste et du zygote de *C. elegans*. Chez les mammifères, il régule la polarité et se localise avec le complexe aPKC à l'extrémité des neurites, spécifiant le futur axone, ainsi qu'au front de migration des astrocytes et au pôle apical des cellules épithéliales (Atwood et al., 2007; Etienne-Manneville and Hall, 2001; Martin-Belmonte et al., 2007; Nishimura et al., 2004; Shi et al., 2004). Chez *C. elegans*, l'antagonisme mutuel entre les groupes de protéines PAR antérieurs et postérieurs dépend essentiellement de la phosphorylation par des kinases présentes au sein de chacun des groupes alors que leur localisation corticale est modulée par des interactions protéiques et/ou lipidiques. Enfin, l'équilibre entre les groupes antérieur et postérieur des protéines PAR est aussi dépendant de leurs niveaux protéiques, du moins chez l'embryon de *C. elegans* où ces niveaux peuvent être régulés.

1.1.3.1. Régulation PAR phosphorylation

aPKC est une protéine kinase C atypique qui contient un domaine sérine/thréonine kinase similaire à celui des protéines kinases conventionnelles mais n'est pas activée par le Diacylglycerol et par le Ca^{2+} comme ces dernières (Newton, 2001). Son activité kinase est un

élément clé dans l'établissement et le maintien de la polarité. Dans les cellules épithéliales de mammifères, aPKC phosphoryle PAR-1b sur un résidu conservé, entraînant sa dissociation de la membrane à l'interface du domaine baso-latéral et du domaine apical (Suzuki et al., 2004). Chez *C. elegans*, elle permet l'exclusion de PAR-2 du cortex antérieur. En effet, PKC-3 phosphoryle 7 résidus serine/thréonine de PAR-2 in vitro et la visualisation de transgènes GFP::PAR-2 phospho-mimétiques ou phospho-déficients pour ces sites montre des défauts de localisation de la protéine (Hao et al., 2006). Motegi et ses collègues ont raffiné ce modèle en déterminant que la liaison de PAR-2 aux phospholipides in vitro est prévenue par la phosphorylation de PKC-3. Par contre, la liaison de PAR-2 aux microtubules du centrosome paternel permet à PAR-2 d'être protégé de cette phosphorylation lorsqu'il rejoint le cortex postérieur durant l'établissement de la polarité (Motegi et al., 2011) (Figure 1.6). Lgl est aussi un substrat d'aPKC. Chez la Drosophile, la phosphorylation de Lgl par aPKC induit une interaction intramoléculaire qui inhibe son activité et son interaction avec le cytosquelette (Betschinger et al., 2005). Chez *C. elegans*, l'activité et la localisation de LGL-1 seraient régulées par phosphorylation de PKC-3, laquelle changerait l'affinité de la protéine pour PAR-6 et PKC-3 (Beatty et al., 2010; Hoege et al., 2010).

PAR-1 et PAR-4 encodent des sérine/thréonine kinases (Guo and Kemphues, 1995; Watts et al., 2000), suggérant qu'elles exercent aussi leur effet par phosphorylation. Chez *C. elegans*, PAR-1 phosphoryle PAR-3 in vitro et chez l'ovocyte de la Drosophile, cette phosphorylation empêche Par3 d'interagir avec aPKC, prévenant l'invasion du complexe Par6/aPKC/Par3 au domaine occupé par Par1 (Benton and St Johnston, 2003; Motegi et al., 2011) (Figure 1.6). Enfin, chez la Drosophile, les mammifères et probablement aussi chez *C. elegans*, PAR-4 phosphoryle et active PAR-1 (Griffin et al., 2011; Lizcano et al., 2004; Wang et al., 2007b).

1.1.3.2. Régulation PAR interactions protéiques

PAR-5 encode une protéine 14-3-3 (Morton et al., 2002) qui lie les résidus serine et thréonine phosphorylés. Elle interagit avec la forme phosphorylée de Par-3 chez la Drosophile et la forme phosphorylée de PAR-1b chez les mammifères et pourrait donc assister le processus d'inhibition mutuelle de ces deux kinases (Benton and St Johnston, 2003; Suzuki et

al., 2004). En accord avec ce rôle, PAR-5 a une localisation corticale symétrique chez le zygote de *C. elegans* et sa déplétion entraîne la perte d'antagonisme entre les groupes antérieurs et postérieurs qui co-localisent alors tout autour du cortex dès l'établissement de la polarité (Cuenca et al., 2003; Morton et al., 2002).

PAR-2 possède un domaine *RING finger* caractéristique des protéines E3 ubiquitine ligases (Levitan et al., 1994). Même si aucun rôle ne lui a été trouvé dans la dégradation protéique et qu'aucune activité E3 ligase ne lui est associé *in vitro* (Boyd et al., 1996), son domaine RING est essentiel à sa localisation et son activité (Hao et al., 2006). Chez *C. elegans*, PAR-2 agit en amont de PAR-1 en régulant sa localisation au pôle postérieur mais aucun homologue n'a été identifié chez d'autres organismes modèles (Boyd et al., 1996) (Figure 1.6).

Enfin, PAR-6 et PAR-3 sont des protéines à domaine PDZ (Etemad-Moghadam et al., 1995; Hung and Kemphues, 1999; Kuchinke et al., 1998) pouvant donc jouer le rôle de protéines d'échafaudages ou d'adaptateurs. PAR-6 et PAR-3 interagissent via leur domaine PDZ et PDZ1 respectifs alors que PAR-6 s'associe avec aPKC via son domaine PB1 (Joberty et al., 2000; Li et al., 2010b; Lin et al., 2000) (Figure 1.6). PAR-6, PAR-3 et aPKC peuvent exister au sein de complexe différents. Par exemple, Par-3 est en compétition avec Lgl pour sa liaison à Par6 dans les cellules épithéliales et chez le neuroblaste de la Drosophile (Wirtz-Peitz et al., 2008; Yamanaka et al., 2006). Chez *C. elegans*, PAR-6/PKC-3 peuvent exister en un complexe indépendamment de PAR-3, lorsque la chaperonne CDC-37 est déplétée, montrant une flexibilité dans la formation du complexe PAR-6/PAR-3/PKC-3 (Beers and Kemphues, 2006). On peut aussi noter que la liaison de PAR-6 à PKC-3, mais pas à PAR-3, semble importante pour le rôle de PAR-6 dans la polarité (Li et al., 2010b).

1.1.3.3. Régulation PAR liaison au cortex

Bien que les mécanismes d'ancrage des protéines PAR au cortex ne soient pas complètement élucidés, ils semblent faire intervenir leur association avec l'acto-myosine ou les lipides membranaires. D'une part, l'utilisation de drogues qui dépolymérisent l'actine prévient la localisation de PAR-3 et PAR-2 au cortex, suggérant un mode d'association

dépendant du cytosquelette d'acto-myosine localisé sous la membrane plasmique (Boyd et al., 1996; Severson and Bowerman, 2003). D'autres études suggèrent que le complexe antérieur pourrait être localisé au cortex indirectement, via une interaction entre PAR-6 et CDC-42. Ce mode d'association de PAR-6 à la membrane semble dominant dès la pro-métaphase mais n'est pas essentiel plus tôt, lors de la phase d'établissement de la polarité (Aceto et al., 2006). PAR-6 contient un domaine semi-CRIB qui lui permet d'interagir avec cette petite GTPase sous sa forme active, liée au GTP, et CDC-42 contient un groupe geranylgeranyl en C-terminal qui pourrait médier son ancrage à la membrane (Gotta et al., 2001; Kay and Hunter, 2001; Schonegg and Hyman, 2006) (Figure 1.6). PAR-6 pourrait aussi utiliser un mode d'association cortical indépendant de CDC-42 et dépendant de PAR-3 (Beers and Kemphues, 2006). En accord avec ce modèle, Par3 lie les lipides membranaires via ses domaines PDZ2 et C-terminal chez la Drosophile et les mammifères (Krahn et al., 2010; Wu et al., 2007a). Chez *C. elegans*, le domaine PDZ2 est aussi essentiel à la localisation corticale de PAR-3 (Li et al., 2010a).

Enfin, PAR-1 et PAR-2 possèdent un domaine riche en acides aminés basiques, lequel interagit directement avec les phospholipides *in vitro* et est essentiel à la localisation membranaire de PAR-2 *in vivo* (Hao et al., 2006; Motegi et al., 2011) (Figure 1.6). PAR-2 pourrait aussi localiser directement PAR-1 à la membrane puisque les deux protéines interagissent et que PAR-2 est importante pour la localisation de PAR-1 au cortex (Boyd et al., 1996; Motegi et al., 2011).

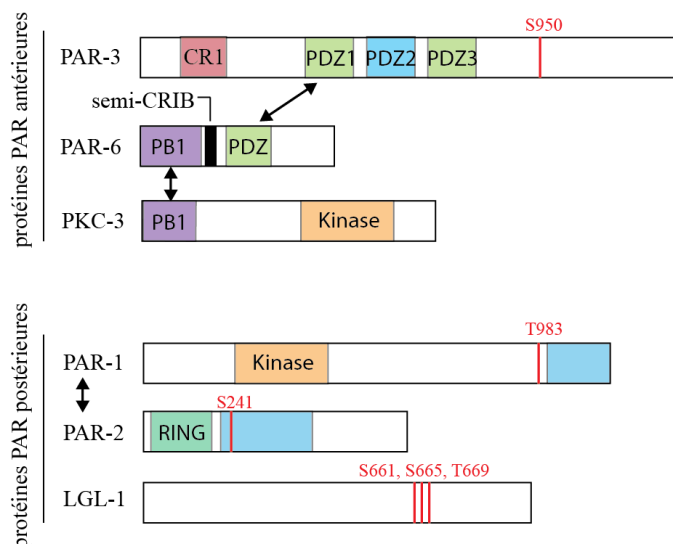


Figure 1.6 Nature moléculaire des protéines PAR.

Organisation des domaines protéiques des protéines PAR. Les doubles flèches montrent les interactions entre les protéines PAR d'un même groupe. Les régions bleues correspondent à des domaines de liaison aux lipides alors que les lignes rouges montrent les sites de phosphorylation par la kinase du groupe de protéines PAR antagoniste (soit PAR-1 ou PKC-3). Le domaine CR1 de PAR-3 pourrait permettre son oligomérisation (Li et al., 2010a). Les abréviations sont données dans la section abréviations. Figure inspirée de (Motegi and Seydoux, 2013)

1.1.4. Contrôle de la division asymétrique par dégradation des déterminants et régulateurs de la polarité

1.1.4.1. La dégradation protéique

La modulation de la dégradation protéique émerge comme un mécanisme clé de la division asymétrique chez l'embryon de *C. elegans*. Plusieurs médiateurs de la polarité sont localisés par un mécanisme faisant intervenir leur dégradation locale. Même les protéines PAR pourraient être sujettes à une régulation fine de leur niveaux, ceux-ci étant importants pour maintenir un équilibre entre les groupes PAR antérieurs et postérieurs. De plus, à un stade embryonnaire précoce où la transcription est inactive et où le développement dépend uniquement des molécules d'ARN et protéines maternelles, la régulation de la dégradation protéique est cruciale pour spécifier le destin des blastomères. Nous verrons dans cette section que la dégradation de certains déterminants arrive à des moments précis lors du développement et est parfois coordonnée par des régulateurs clés du cycle cellulaire, démontrant un premier lien unissant ces deux processus chez l'embryon.

Chez les eucaryotes, la dégradation protéique fait intervenir une modification post-traductionnelle de la protéine cible : la poly-ubiquitinylation. Celle-ci consiste en la conjugaison de l'ubiquitine, une protéine conservée de 76 acides aminés qui est liée de façon covalente à un résidu lysine de la protéine cible. Trois enzymes agissent de façon séquentielle pour lier les chaînes d'ubiquitine au substrat : E1, (*ubiquitine activating enzyme*) qui active l'ubiquitine et la transfère sur l'enzyme E2 (*ubiquitine conjugating enzyme*), laquelle prépare l'ubiquitine pour la conjugaison par l'enzyme E3 (*ubiquitine-protein ligase*) qui lie E2 et la protéine cible, conférant la spécificité du substrat à dégrader (Hershko and Ciechanover, 1998; Pickart, 2000). Comme chez les autres eucaryotes, il n'y a qu'une E1 chez *C. elegans* (UBA-1), quelques E2 (UBC-1-3, UBC-6-9, UBC-12-26) et plusieurs E3 qui sont regroupées en 4 catégories; les protéines à domaine HECT, les protéines U-box, les protéines RING finger monomériques et les complexes multimériques (Passmore and Barford, 2004). Ces derniers sont typiquement composés d'une culline (CUL-1, CUL-2, CUL-3 chez *C. elegans*), qui sert de protéine d'échafaudage du complexe, de ses adaptateurs (tel que Skp1 et Elongine B/C), d'une protéine RING finger, qui lie E2 et la culline (tel que RBX-1), et d'un facteur de

reconnaissance du substrat qui est variable (tel que les protéines F-box, BC-box) (Petroski and Deshaies, 2005).

1.1.4.2. Les complexes culline régulent la dégradation des déterminants cellulaires

Les complexes culline RING ligases (CRL) assistent la dégradation de plusieurs déterminants cellulaires maternels, contribuant à leur localisation asymétrique. Ils sont aussi impliqués dans progression méiotique, via leurs fonctions dans la dégradation des cyclines, et coordonnent donc la mise en place de la polarité au cours du cycle cellulaire. Ce dernier aspect sera discuté dans la section 1.3.

L'un des complexes culline qui modulent la localisation des médiateurs de la polarité en régulant leur dégradation locale est le complexe CRL2^{ZIF-1}. Il est composé de la culline CUL-2 qui s'associe d'une part à RBX-1, lequel recrute la E2 (UBC-5), et d'autre part aux adaptateurs Elongine B/C, qui lient la sous unité de reconnaissance du substrat ZIF-1. Ce complexe CRL2^{ZIF-1} agit de concert avec MEX-5/6 pour exclure les déterminants cytoplasmiques PIE-1, POS-1 et MEX-1 des blastomères somatiques après chaque division (DeRenzo et al., 2003). PIE-1 est une protéine contenant des domaines doigt de zinc CCCH en tandem et inhibe la transcription des gènes impliqués dans le développement somatique tout en promouvant la traduction d'ARN maternels impliqués dans le destin cellulaire germinale. PIE-1 doit donc être hérité par le précurseur de la lignée germinale après chaque division (Mello et al., 1996; Mickey et al., 1996; Seydoux and Dunn, 1997; Seydoux et al., 1996; Tenenhaus et al., 2001). Dès la première division du zygote, PIE-1 se localise au pôle postérieur par un mécanisme en deux étapes, faisant intervenir son enrichissement au postérieur puis sa dégradation à l'antérieur (Reese et al., 2000). D'une part, tout comme pour MEX-5/6, la mobilité différente de PIE-1 à l'antérieur et au postérieur est à l'origine de sa localisation en gradient et de son enrichissement au postérieur (Daniels et al., 2010). D'autre part, la dégradation de PIE-1 à l'antérieur dépend du complexe CRL2^{ZIF-1} dans lequel ZIF-1 interagit avec le motif doigt de zinc CCCH (ZF1) de PIE-1. CRL2^{ZIF-1} est régulé positivement à l'antérieur par MEX-5/6 (DeRenzo et al., 2003), mais pas au postérieur où PAR-1 maintien

de bas niveaux de MEX-5/6 (Schubert et al., 2000). Cette activation asymétrique CRL2^{ZIF-1} prévient la dégradation de PIE-1 dans le précurseur de la lignée germinale. Fait intéressant, CRL2^{ZIF-1} régule aussi les niveaux de MEX-5/6 à des stades embryonnaires plus avancés, ainsi que ceux de POS-1 et MEX-1 dès la première division du zygote, suggérant un rôle prépondérant de CRL2^{ZIF-1} dans la dégradation des protéines avec motif en doigt de zinc CCCH au sien de la lignée somatique (DeRenzo et al., 2003).

OMA-1 et OMA-2 sont deux autres protéines à doigt de zinc importantes pour la transition ovocyte-embryon. Elles permettent d'inhiber la dégradation de certains déterminants cytoplasmiques avant la polarisation de l'embryon et de réprimer globalement la transcription zygotique aux stades embryonnaires précoces. Pour ce faire, les protéines OMA répriment en un premier temps la traduction de la sous unité *zif-1* du complexe CRL2^{ZIF-1} chez l'ovocyte et durant la transition ovocyte-embryon. Ensuite, elles séquestrent TAF-4, une composante du complexe de pré-initiation de la transcription par l'ARN polymérase II, jusqu'à ce qu'elles soient dégradées, au stade deux cellule (Güven-Ozkan et al., 2008). La phosphorylation d'OMA-1 et OMA-2 par la kinase MBK-2 (*minibrain kinase 2*) coordonne séquentiellement ces deux fonctions chez l'ovocyte et chez l'embryon (Güven-Ozkan et al., 2010). En effet, elle permet en un premier temps de relâcher l'inhibition des protéines OMA sur *zif-1* chez le zygote (Güven-Ozkan et al., 2008) ce qui entame le processus de leur dégradation qui se poursuit jusqu'au stade 2 cellules. Une fois dégradé, TAF-4 est ensuite libre d'entrer le noyau et la transcription zygotique peut commencer pour soutenir la poursuite du développement embryonnaire (Lin, 2003). Cette dégradation des protéines OMA fait intervenir un complexe SCF E3 ligase composé de la culline CUL-1 qui s'associe d'une part à RBX-1, lequel recrute la E2 et d'autre part aux adaptateurs SKR-1 et SKR-2 (homologues de Skp1) qui lient la sous unité de reconnaissance du substrat, une protéine F-Box non identifiée (Güven-Ozkan et al., 2008; Shirayama et al., 2006).

Les kinases KIN-19 (homologue de la caseine kinase 1) et CDK-1 (la cycline dépendant kinase 1) sont aussi impliquées dans la dégradation d'OMA-1 puisque leur mutation inhibe celle-ci. CDK-1 est essentielle à la progression méiotique et mitotique, mais son rôle dans la dégradation d'OMA-1 semble être indépendant de ses fonctions dans le cycle cellulaire. En effet, le mutant *cdk-1(ne2257)*, qui code pour une protéine qui phosphoryle

l'histone H1 et permet une progression normale des divisions méiotique et mitotiques, présente une stabilisation des niveaux d'OMA-1. Cette stabilisation est aussi observée lors de la déplétion de la cycline B CYB-3, suggérant que cette cycline donne la spécificité de substrat à CDK-1 pour son rôle dans la dégradation d'OMA-1. Par contre, *cdk-1(ne2257)*, qui porte une mutation dans la boucle T, un domaine impliqué dans la liaison aux cyclines, n'affecte pas la liaison de la kinase avec CYB-3 (Shirayama et al., 2006). Bien que son rôle dans la dégradation des protéines OMA reste nébuleux, CDK-1 pourrait agir comme senseur pour réguler la bonne coordination temporelle de la dégradation d'OMA au cours du cycle cellulaire.

1.1.4.3. La polarité peut être régulée par dégradation des protéines PAR

Bien que les groupes de protéines PAR antérieur et postérieur préviennent leur chevauchement mutuel par phosphorylation, il n'y a pas de barrière nette entre les deux groupes durant la phase de maintien de la polarité. Ainsi GFP::PAR-2 peut diffuser un peu au domaine antérieur alors que GFP::PAR-6 peut diffuser un peu au domaine postérieur. Des analyses *in vivo* et des modélisations ont montré que le maintien du domaine antérieur et postérieur des protéines PAR dépend de leur échange entre un état cytoplasmique et un état membranaire dans lequel elles diffusent latéralement. Du côté antérieur de la frontière entre les deux groupes, une plus grande concentration de PAR-3/PAR-6/PKC-3 favorisera une dissociation corticale de PAR-2 qui sera redistribué au cytoplasme pour être relocalisé à son domaine membranaire propre. Le même processus s'applique pour les protéines PAR antérieures, lorsqu'elles s'étendent du côté postérieur (Goehring et al., 2011a; Goehring et al., 2011b). À ce modèle s'ajoute l'effet limitant du pool de protéines PAR disponible dans l'expansion de leur domaine propre. D'une part, Goering et ses collègues ont montré que des changements dans la quantité d'une protéine PAR donnée affecte la position de la frontière entre les domaines antérieur et postérieur (Goehring et al., 2011b). D'autre part, la perte d'une protéine PAR chez l'un des deux groupes abolit l'antagonisme réciproque entre les protéines PAR antérieures et postérieures, entraînant la colonisation de tout le cortex par l'autre groupe et une létalité embryonnaire subséquente. Il a été démontré qu'une modulation de la

stœchiométrie des protéines PAR est suffisante pour prévenir cette perte de polarité et létalité embryonnaire. Par exemple, chez les mutants *par-6(+/-); par-2(-/-)*, la diminution de moitié des niveaux protéiques de PAR-6 est suffisant pour supprimer la délocalisation du complexe antérieur vers le postérieur en absence de PAR-2 (Watts et al., 1996). Ainsi, on peut concevoir que des suppresseurs ou des *enhancers* de la létalité associée à la perte de *par-2* puissent respectivement être des régulateurs positifs ou négatifs des niveaux protéiques des protéines PAR antérieures. C'est le cas de *lgl-1*, un *enhancer* de la létalité des mutants *par-2* et c'est aussi le cas de *nos-3*, un suppresseur de létalité des mutants *par-2* et homologue du répresseur traductionnel nanos. Dans le premier cas, les niveaux de PAR-6 sont régulés négativement par LGL-1, et conséquemment, une surexpression de LGL-1 peut rétablir la polarité chez les mutants *par-2* (Beatty et al., 2010; Hoegel et al., 2010). Comme chez la Drosophile, LGL sert donc de tampon moléculaire pour contrer l'expansion du domaine PAR-6/PAR-3/PKC-3. Cependant, le mécanisme utilisé est différent entre les deux organismes, puisque chez *C. elegans* il fait intervenir la régulation des niveaux protéiques de PAR-6 plutôt que la dissociation membranaire du complexe antérieur comme chez la Drosophile (Beatty et al., 2013). Dans le deuxième cas, la déplétion de *nos-3* supprime la létalité et les défauts de polarité des mutants *par-2* en entraînant une diminution des niveaux protéiques de PAR-6. La dégradation de PAR-6 chez les mutants *nos-3* est dépendante de la culline CUL-2 qui agit au sein du complexe E3 ligase CBC^{FEM-1} composé de l'Elongine B/C et de l'adaptateur de substrat FEM-1 et des adaptateurs FEM-2 et FEM-3 (Pacquelet et al., 2008; Starostina et al., 2007). FEM-1 contient des répétitions ankyrines via lesquelles elle pourrait interagir avec d'autres protéines (Spence et al., 1990), FEM-2 est une sérine-thréonine phosphatase dont le substrat endogène est inconnu (Chin-Sang and Spence, 1996) et FEM-3 est une protéine sans motifs particuliers (Ahringer et al., 1992). CBC^{FEM-1} fut à l'origine identifié comme le complexe E3 ligase régulant la dégradation de TRA-1, un facteur de transcription impliqué dans la détermination du sexe chez *C. elegans* (Starostina et al., 2007). Puisque la dégradation de PAR-6 dépend de CUL-2 et que PAR-6 interagit avec FEM-1, le complexe CBC^{FEM-1} pourrait réguler la dégradation de PAR-6. De plus, les adaptateurs connus du complexe CBC^{FEM-1}, soit FEM-2 et FEM-3 sont importants pour la suppression de la létalité chez les doubles mutants *nos-3; par-2*, suggérant que FEM-2 et FEM-3 agissent aussi avec CUL-2 pour dégrader PAR-6. Enfin, NOS-3 réprime la traduction de FEM-3 dans la lignée germinale

(Kraemer et al., 1999) laissant entrevoir un mécanisme de régulation de l'activité du complexe CBC^{FEM-1} par NOS-3, via la modulation des niveaux de FEM-3.

La régulation des niveaux protéiques de PAR-6 fait donc intervenir différents acteurs et pourrait être un moyen efficace d'assurer le maintien de polarité chez *C. elegans*. Cependant, PAR-6 n'est pas la seule protéine PAR dont les niveaux peuvent être modulés chez certains mutants. Par exemple, CDC-37, une chaperonne qui s'associe avec les protéines kinases nouvellement synthétisées, stabilise les niveaux de PKC-3 (Brajenovic et al., 2004). Contrairement à celle de *nos-3* et *lgl-1*, la déplétion de *cdc-37* entraîne des défauts de polarité qui pourraient en partie être expliqués par la diminution des niveaux de PKC-3 (Beers and Kempfues, 2006)

1.2. Liens entre cycle cellulaire et polarité cellulaire

Tel que mentionné précédemment, les événements du cycle cellulaire sont couplés à ceux de la polarité lors des divisions asymétriques de *C. elegans*. Ainsi, certains aspects du cycle cellulaire sont régulés par des effecteurs de la polarité et, inversement, certains régulateurs mitotiques ainsi qu'une progression correcte dans le cycle cellulaire sont importants pour la division asymétrique de l'embryon. Cette section s'intéresse aux liens unissant ces deux processus cellulaires.

1.2.1. Le cycle cellulaire chez *C. elegans*

Tous les organismes multi-cellulaires sont le produit de divisions cellulaires qui se perpétuent depuis le début de la vie terrestre et durant lesquelles les cellules dupliquent leur contenu et se divisent en deux. Le cycle cellulaire regroupe les événements qui rendent possible cette division et, pour la mitose, les étapes cruciales incluent une phase de synthèse d'ADN, la phase S, suivie d'une phase de ségrégation des chromosomes au sein des deux cellules filles diploïdes, la phase M. La méiose diffère de la mitose puisqu'elle est réductionniste pour le nombre de chromosomes; ses deux phases M génèrent ultimement des gamètes haploïdes. Les cellules somatiques comprennent aussi souvent des phases *Gap* avec la

phase G1 qui couvre la période entre la complétion de la phase M et l'initiation de la phase S du cycle suivant, la phase G2 qui sépare la phase S de la phase M, et la phase G0 qui est une phase de quiescence cellulaire, temporaire ou permanente, faisant suite à la phase G1 et dont l'initiation dépend de signaux environnementaux ou développementaux. Lors du développement embryonnaire, la vitesse de prolifération cellulaire prime et les phases G0 et G1 ainsi que les mécanismes de point de contrôle sont moins robustes, ce qui permet probablement d'éviter des délais prolongés dans le cycle cellulaire qui seraient délétères lors de l'embryogenèse (Bolton et al., 1984; Edgar and McGhee, 1988; Knoblich et al., 1994). Ainsi, l'embryon de *C. elegans* cycle entre les phases S et M lors des premières divisions mitotiques.

En 1878, à l'aide d'un simple microscope, Flemming observe la ségrégation des chromosomes lors de la division mitotique chez des cellules de salamandre colorées avec l'aniline. Ce n'est qu'une centaine d'années plus tard que le mécanisme gouvernant la progression du cycle cellulaire est mis en lumière par les travaux de Leland Hartwell, Paul Nurse et Tim Hunt, tous les trois récompensés en 2001 par le prix Nobel de médecine. Leurs découvertes ont permis de déterminer que les cycles méiotiques et mitotiques sont sous contrôle d'une machinerie intrinsèque dont les acteurs principaux sont les kinases dépendantes des cyclines, les Cdks.

Ces Cdks sont des petites serine/thréonine kinases qui s'associent avec leur sous-unité régulatrice appelée cycline, lesquelles contrôlent leur activité et leur spécificité de substrat (Beach et al., 1982; Evans et al., 1983; Nurse et al., 1976). Chez les eucaryotes, les différents complexes cyclines/Cdks régulent la progression unidirectionnelle du cycle cellulaire en promouvant les activités de leur phase associée et en inhibant celles des phases subséquentes. Typiquement, chez les mammifères, Cdk4 et Cdk6 s'associent avec les cyclines D et régulent la phase G1 de croissance cellulaire puis Cdk2 s'associe avec la cycline E et la cycline A pour permettre la transition G1/S, le déroulement de la phase S puis la transition S/G2, assurant ainsi la réplication de l'ADN. Enfin, les cyclines A et B s'associent avec Cdk1 pour réguler la transition G2/M et la phase M. Cdk1 est la seule kinase dépendante des cyclines gouvernant le cycle cellulaire chez la levure, elle est essentielle à l'entrée en phase M et régule la ségrégation des chromosomes (Morgan, 2007). Il est intéressant de noter que les cyclines et les Cdks ne

sont pas toutes essentielles au déroulement du cycle cellulaire chez les différents organismes. Chez la Drosophile, cycline A, B/Cdk1 et cycline E/Cdk2 régulent respectivement la phase M et la phase S et sont les seuls complexes cycline/Cdk essentiels à la viabilité (Knoblich and Lehner, 1993; Knoblich et al., 1994; Lehner and O'Farrell, 1990). Chez la levure, la simple modulation des niveaux de Cdk1 est suffisante pour gouverner le cycle cellulaire (Coudreuse and Nurse, 2010). Chez les mammifères, Cdk1 et les cyclines A et B sont essentielles (Geng et al., 2003; Santamaria et al., 2007) même si Cdk4, Cdk6 et Cdk2 sont requises pour la prolifération de certains types cellulaires (Malumbres et al., 2004; Martin et al., 2003; Moons et al., 2002; Ortega et al., 2003). Chez *C. elegans*, les cyclines B CYB-1 et CYB-3 associées à CDK-1, la cycline E CYE-2 associée à CDK-2 et la cycline D CYD-1 associée à CDK-4 sont toutes essentielles à la viabilité. Les complexes cyclines B CDK-1 régulent les divisions cellulaires de l'embryon et celles des cellules souches et progéniteurs germinaux (CSPG) de l'adulte (Boxem et al., 1999). CDK-2 et CDK-4 sont toutes deux requises chez l'embryon tardif alors que Cycline E/CDK-2 est aussi essentielle aux cycles mitotiques des CSPG (Boxem and van den Heuvel, 2001; Cowan and Hyman, 2006; Fox et al., 2011; Jeong et al., 2011; Park and Krause, 1999) (Figure 1.7).

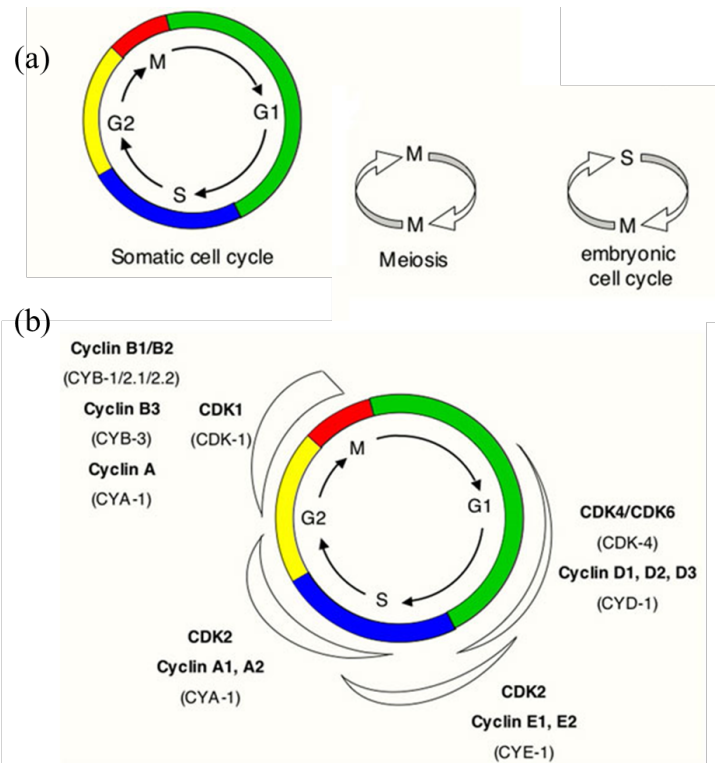


Figure 1.7 Les phases du cycle cellulaire.

(a) Représentation simplifiée du cycle cellulaire chez des cellules somatiques, des cellules en méiose et des cellules embryonnaires. La phase S est la phase de synthèse d'ADN, la phase M représente la mitose et les phases G1 et G2 sont les phases *Gap*. (b) Chaque complexe cycline/CDK permet l'entrée et la progression à travers une phase spécifique du cycle cellulaire. Les différentes cyclines et CDK présentes chez les mammifères sont écrites en caractère gras et leurs homologues chez *C. elegans* sont donnés entre parenthèses. Figure adaptée avec permission, provenant de (van den Heuvel, 2005) © wormbook.org. Lien vers la licence : <https://creativecommons.org/licenses/by/2.5/>

1.2.2. Le complexe cycline B/Cdk1 lors de l'entrée en phase M

Les divisions précoces de l'embryon de *C. elegans* cyclent rapidement entre les phases S et M, accomplissant la duplication des chromosomes, leur séparation et la cytokinèse en 15 à 20 minutes. CDK-1 est la seule Cdk essentielle à la progression du cycle cellulaire lors de la première division mitotique de l'embryon et sa perte mène à un arrêt avant l'entrée en phase M (Boxem et al., 1999; van der Voet et al., 2009). Les complexes cycline B/Cdk1 régulent leur substrat par phosphorylation sur un résidu sérine ou thréonine d'une séquence consensus

S/T-P-x-K/R, bien que la phosphorylation à des sites non consensus ait aussi été observée *in vitro* (Harvey et al., 2005; McCusker et al., 2007). Ce sont les cyclines B qui donnent la spécificité de substrat à Cdk1. Leur motif MRAIL, localisé dans la première hélice alpha du domaine *Cycline Box*, interagit avec les motifs RXL des substrats. Ces derniers incluent, entre autres, la condensine, les histones H1 et H3, les lamines, les protéines associées aux microtubules ce qui permet de coordonner séquentiellement la condensation des chromosomes, le bris de l'enveloppe nucléaire, l'assemblage du fuseau mitotique et d'assurer la séparation adéquate des chromosomes en mitose (Morgan, 2007).

Une étape clé de l'activation de Cdk1 en mitose est sa liaison aux cyclines B. La liaison de la cycline au motif PSTAIRE de l'hélice alpha 1 de Cdk entraîne une reconfiguration du site actif. Celle-ci permet la réaction de phosphorylation ainsi que le déplacement de la boucle d'activation T qui, sinon, bloque la surface de liaison du substrat (Morgan, 2007). La régulation des niveaux et de la localisation des cyclines B est donc critique pour l'activation de Cdk1. Leur transcription est maximale en phase G2, et leur niveau protéique atteint un seuil de concentration déterminant en phase M (Fung and Poon, 2005; Solomon et al., 1990). Quant à leur localisation, elle oscille entre le cytoplasme (en phase S), les centrosomes (en phase G2) et le noyau (en phase M) et dépend de la phosphorylation de leur domaine N terminal (Hagting et al., 1998; Toyoshima et al., 1998; Yang et al., 1998).

Pour permettre la transition métaphase-anaphase et la complétion de la mitose ou de la méiose, le complexe cycline B/CDK-1 doit être inactivé et la dégradation des cyclines est une étape clé dans ce processus. Elle nécessite la boîte de destruction localisée en N terminal des cyclines qui cible les cyclines B pour la dégradation par le complexe E3 ligase APC^{Cdc20} (Glotzer et al., 1991; King et al., 1995; Murray et al., 1989; Sudakin et al., 1995). Alors que Cdc20 active l'APC pour la sortie initiale en mitose, Cdh1 active l'APC en télophase et en phase G1, de façon à maintenir la destruction des cyclines jusqu'au prochain cycle cellulaire. Cdh1 est donc souvent absent dans les divisions embryonnaires qui cyclent rapidement entre les phases S et M (Zachariae and Nasmyth, 1999) (Figure 1.8).

En plus de la liaison aux cyclines, l'activation de Cdk1 nécessite des étapes de phosphorylation et de déphosphorylation séquentielles effectuées par un réseau de kinases et de phosphatase qui forment ensemble une boucle de régulation positive activant le complexe

cycline B/Cdk1 de façon irréversible. La kinase activatrice de Cdk (CAK) active Cdk1 en phosphorylant la thréonine 161 conservée de la boucle d'activation T tout au long du cycle cellulaire (Desai et al., 1992; Gould et al., 1991; Solomon et al., 1992). Par contre Aurora A, Plk1, et Cdc25 initient la cascade de phosphorylation/déphosphorylation qui converge vers l'activation du complexe cycline B/Cdk1 spécifiquement en phase M. D'abord, l'activation de Plk1 par phosphorylation se fait en phase G2 et est maintenue en phase M par la kinase Aurora A (Hutterer et al., 2006). Chez l'homme et chez *C. elegans*, Bora lie Plk1 ce qui favorise sa phosphorylation par Aurora A (Seki et al., 2008; Tavernier et al., 2015). Chez *C. elegans*, la phosphorylation préalable de SPAT-1 (homologue de Bora) par CDK-1 promeut la liaison de SPAT-1 à PLK-1, générant ainsi une boucle d'auto-activation positive sur l'activité de CDK-1 (Tavernier et al., 2015). Plk1 possède un domaine polo-box PBD qui lie les résidus thréonines et sérines phosphorylés par d'autres kinases telles que Cdk1 (Elia et al., 2003a; Elia et al., 2003b). Le contrôle spatio-temporel de Plk1 est donc influencé par les kinases qui phosphorylent préalablement les substrats de Plk1, facilitant leur reconnaissance et leur seconde phosphorylation par Plk1 (Bruinsma et al., 2012). Plk1 active les cycline B et inactive les kinases inhibitrices Myt1 (Inoue and Sagata, 2005) et Wee1 (Watanabe et al., 2004), lesquelles sont responsable des phosphorylations inhibitrices sur les résidus conservés Thr 14 et Tyr 15 de Cdk1 (Mueller et al., 1995; Russell and Nurse, 1987). Cdc25 enlève ces phosphorylations inhibitrices sur Cdk1 et est donc essentielle à son activation (Russell and Nurse, 1986). La phosphatase Cdc25 est elle aussi activé par la phosphorylation de Plk1 (Kumagai and Dunphy, 1996) et d'Aurora A (Cazales et al., 2005; Dutertre et al., 2004). Chez *C. elegans*, un seul des quatre homologues de Cdc25, CDC-25.1, deux des quatre cyclines B, CYB-1 et CYB-3 en complexe avec CDK-1 ainsi qu'une des trois Plk, PLK-1, sont essentielles à la progression du cycle cellulaire (Ashcroft et al., 1999; Boxem et al., 1999; Chase et al., 2000; van der Voet et al., 2009) (Figure 1.8). Enfin, tous les eucaryotes possèdent des inhibiteurs de CDK (appelés CKI) qui peuvent inhiber les cyclines des phases S et M afin d'établir une phase G1 stable entre les divisions de cellules en prolifération (Cheng et al., 1999; Fukuyama et al., 2003). Deux de ces inhibiteurs, de la famille Cip/Kip, CKI-1 et CKI-2, sont les homologues de p27^{Kip1} et p21^{Cip1} chez *C. elegans*. L'absence de CKI-1 entraîne plusieurs défauts de prolifération chez les embryons tardifs (Fukuyama et al., 2003) en plus d'affecter des aspects de détermination cellulaire au sein de la gonade somatique (Kostic et al., 2003).

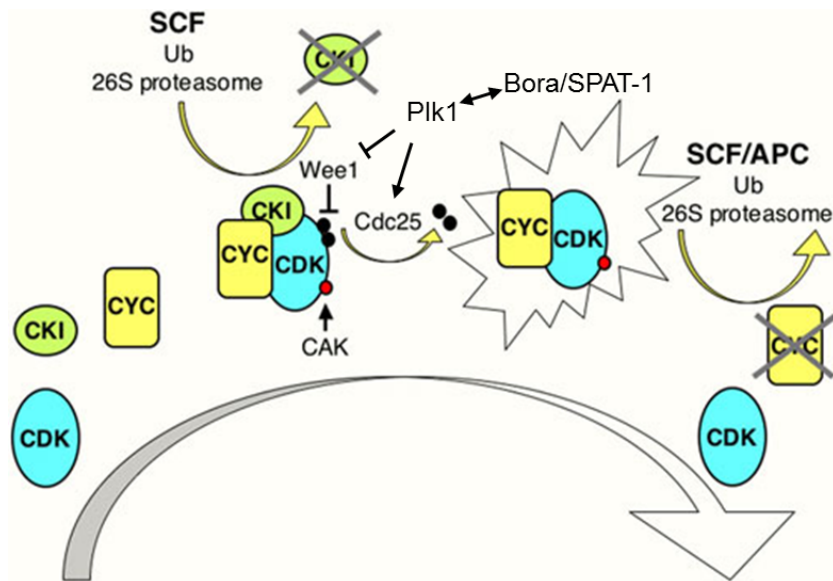


Figure 1.8 Modèle général d'activation des complexes cycline /CDK

L'activation des CDKs (ici CDK1) est régulée à de multiples niveaux, notamment par sa liaison aux cyclines B, par la dégradation des inhibiteurs des CDKs, par phosphorylation activatrice (médiée par la CAK) et par déphosphorylation (médiée par Cdc25). Le complexe APC dégrade les cyclines B en fin de phase M, permettant la transition métaphase-anaphase. Ce modèle est basé sur des études effectuées chez différents eucaryotes. CDK : kinase dépendante des cyclines, CYC : cycline, CAK : kinase activatrice de CDK, CKI : inhibiteur des CDK, Ub : Ubiquitine, SCF : complexe contenant Skp, Cullin, F-box, APC : complexe de promotion de l'anaphase, SPAT-1 : suppresseur de *par-2*. Figure adaptée avec permission, provenant de (van den Heuvel, 2005) © wormbook.org. Lien vers la licence : <https://creativecommons.org/licenses/by/2.5/>

1.2.3. Les principaux évènements du cycle cellulaire méiotique précédant l'établissement de la polarité chez le zygote

L'ovocyte de *C. elegans* est arrêté en prophase de méiose I, et le premier évènement du cycle cellulaire déclenché par la fertilisation est la complétion de la méiose maternelle (McNally and McNally, 2005; Ward and Carrel, 1979). Cette transition dans le cycle cellulaire est essentielle à l'établissement du futur axe de polarité antéro-postérieur (cet aspect sera décrit dans la section 1.3.1.5). La progression méiotique du zygote dépend essentiellement de l'activité de la kinase CDK-1 associée aux cyclines de type B CYB-1 et CYB-3. Bien que n'ayant pas un rôle essentiel, les deux autres cyclines de type B, CYB-2.1 et CYB-2.2, participent aussi aux évènements du cycle cellulaire puisque seule la déplétion des quatre cyclines B phénocopie une perte de CDK-1 (van der Voet et al., 2009).

En absence de CDK-1 maternel, les ovocytes fertilisés ne procèdent pas à la métaphase de méiose I (Boxem et al., 1999; Golden et al., 2000). Individuellement, la déplétion de *cyb-1* entraîne un alignement et une ségrégation anormale des chromosomes et celle de *cyb-3* cause un délai dans la progression en méiose II ainsi qu'une ségrégation anormale des chromosomes (van der Voet et al., 2009). Chez *C. elegans*, la dégradation des cyclines B durant la méiose I et la mitose se fait essentiellement par le complexe E3 ligase APC (Furuta et al., 2000; Golden et al., 2000; Shakes et al., 2003). La mutation des sous-unités essentielles de ce complexe, incluant *mat-1* et *apc-4*, entraîne un arrêt en méiose chez l'embryon et bloque les divisions des cellules souches et progéniteurs germinaux chez l'adulte (Cinquin et al., 2010; Furuta et al., 2000). La progression en anaphase de méiose II nécessite quant à elle des évènements de dégradation par le complexe multimérique CUL-2^{zyg-11} composé de la cullin CUL-2, de l'élongine C ELC-1, de la protéine Rbx RBX-1 et de la sous-unité de reconnaissance du substrat ZYG-11. Il a notamment été montré que les niveaux de CYB-3 et de CYB-1 sont stabilisés chez les embryons déplétés de CUL-2 ou ZYG-11 (Liu et al., 2004; Sonnevile and Gönczy, 2004).

1.2.4. Les évènements du cycle cellulaire sont couplés aux évènements de la polarité chez *C. elegans*

1.2.4.1. L'interphase

Lors de la mitose, la phase G1 est souvent le point de départ du cycle cellulaire et contient le point de non-retour à partir duquel la cellule est engagée de façon irréversible en mitose, indépendamment des signaux externes. La phase G1 est une phase de croissance cellulaire et de préparation à la phase suivante. Elle implique entre autres la formation des complexes de pré-réplication qui permettront l'initiation de la réplication aux origines de réplifications lors de la phase S (Aladjem, 2007). Dans les cellules somatiques des mammifères, ces évènements sont sous contrôle des kinases Cdk4/6 associées aux cyclines D (Morgan, 2007). Chez *C. elegans*, ce complexe est formé de la kinase CDK-4 et de la cycline CYD-1 et est essentiel seulement à partir des stades avancés de l'embryogenèse, probablement parce que les divisions embryonnaires précoces se font sans phase G1 et sans croissance cellulaire (Boxem and van den Heuvel, 2001; Park and Krause, 1999).

Chez les métazoaires, la cycline E s'associe avec Cdk2 pour promouvoir la transition G1/S dans le cycle cellulaire, puis la cycline A s'associe avec Cdk2 durant la phase S et permet la transition S/G2 (Morgan, 2007). C'est durant la phase S que les chromosomes sont dupliqués et, chez l'embryon unicellulaire de *C. elegans*, cette phase coïncide avec le début des contractions asymétrique qui marquent l'établissement de la polarité (Edgar and McGhee, 1988). Lors de la deuxième division cellulaire, la réplication de l'ADN se fait à des rythmes différents dans les deux cellules AB et P1 (Benkemoun et al., 2014). La dynamique de réplication chez AB et P1 a été analysée dans des lignées transgéniques GFP::PCN-1 par la quantification des régions fortement enrichies en PCN-1, l'orthologue de PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). PCNA est un facteur s'associant à l'ADN polymérase pour augmenter sa processivité et est incorporé au réplisomes associés aux sites actifs de réplication (Essers et al., 2005; Meister et al., 2007). L'étude de Benkemoun a montré que les régions enrichies en GFP::PCN-1 sont plus nombreuses dans AB, même si l'enrichissement maximal de GFP::PCN-1 en début de phase S est atteint au même moment dans AB et P1. Ceci suggère que la réplication est initiée en même temps dans les deux cellules et que l'un des mécanismes

contribuant à l'entrée tardive en mitose chez P1 fait intervenir une réplication plus lente de son ADN. Cette asymétrie est sous contrôle de PAR-4 et de PAR-1, qui régulent négativement le nombre de fourches de réplifications actives dans P1 par rapport à AB (Benkemoun et al., 2014).

Tel que mentionné précédemment, un point de contrôle de la réplication de l'ADN existe dans la cellule P1, mais pas la cellule AB et constitue le deuxième mécanisme responsable du caractère asynchrone de la deuxième division. Lors de la régulation du point de contrôle de la réplication, la kinase ATR phosphoryle et active la serine-thréonine kinase Chk1 qui à son tour phosphoryle la phosphatase Cdc25, l'empêchant d'activer Cdk1, ce qui bloque l'entrée en phase M (Raleigh and O'Connell, 2000; Rhind and Russell, 2000). Brauchle et ses collègues ont montré que ATL-1 (orthologue de ATR) et CHK-1 (orthologue de Chk1) sont préférentiellement activés dans le plus petit blastomère, ce qui est responsable du délai dans l'entrée en phase M chez la cellule P1. Le mécanisme ferait potentiellement intervenir le caractère limitant des facteurs du point de contrôle, qui serait exacerbé par la différence de taille entre les blastomères AB et P1 (Brauchle et al., 2003; Encalada et al., 2000; Kalogeropoulos et al., 2004). Cette répartition des facteurs du point de contrôle en fonction de la taille des blastomères a été démontrée par l'analyse du cycle cellulaire lorsque GOA-1 et GPA-16 sont inactivées, une condition qui résulte en la formation d'un fuseau mitotique central. Deux cellules filles de tailles égales sont alors générées malgré une distribution asymétrique des protéines PAR et déterminants cytoplasmiques (Gotta and Ahringer, 2001). Dans ces conditions, la diminution de l'asynchronie entre les divisions de AB et P1 est comparable à celle des embryons déplétés de ATL-1/CHK-1 ou des quatre protéines ATL-1/CHK-1/GOA-1/GPA-16 (Brauchle et al., 2003; Encalada et al., 2000; Kalogeropoulos et al., 2004).

Il existe donc deux mécanismes de la phase S qui sont responsables de l'entrée tardive en phase M dans le blastomère P1 : l'un est régulé par PAR-4 et PAR-1 et génère une activité répllicative moins intense chez P1 et l'autre est dépendant de la taille des cellules filles (régulée en aval des autres protéines PAR) et génère un point de contrôle de la réplication préférentiellement actif dans P1.

C'est aussi lors de la phase S qu'est entreprise la réplication des centrioles de chaque centrosome lesquels forment, avec le matériel péricentriolaire, le centre organisateur des microtubules (MTOC) de la cellule. Celui-ci est responsable d'établir le réseau de microtubules nécessaire à la ségrégation des chromosomes en phase M. Chez *C. elegans*, le spermatozoïde apporte la première paire de centrioles (Albertson, 1984; Wolf et al., 1978). Leur duplication/maturation commence lors de l'apparition visible des pronoyaux, en phase S, pour se poursuivre durant la migration des pronoyaux, en prophase (Pelletier et al., 2006). Plusieurs protéines contribuent à la duplication et à la maturation des centrosomes durant la première division, incluant SAS-4/5/6, ZYG-1, SPD-5, SPD-2 (Delattre et al., 2004; Hamill et al., 2002; Leidel et al., 2005; Pelletier et al., 2006; Pelletier et al., 2004). La déplétion de SPD-5 et SPD-2 entraîne à la fois des défauts de cycle cellulaire et des défauts de polarité, en accord avec la dualité du rôle du centrosome dans ces deux processus (Cowan and Hyman, 2004). Bien qu'il ne soit pas nécessaire à la progression méiotique ou mitotique, le complexe CDK-2/CYE-1 joue un rôle dans le recrutement des protéines SPD-2 et SPD-5 au centrosome durant l'établissement de la polarité. Ainsi, la déplétion de la cycline E CYE-1 par RNAi n'a pas d'effet majeur sur la durée du cycle cellulaire et entraîne un arrêt dans le développement qu'au stade 100 cellules, lors de l'établissement d'une phase G1 dans le cycle (Brodigan et al., 2003; Fay and Han, 2000). Toutefois, puisque le complexe CDK-2/CYE-1 favorise le recrutement des protéines SPD-2 et SPD-5 au centrosome, sa perte entraîne des défauts de polarité similaires à ceux causés par une perte du centrosome; une absence d'établissement de la polarité contractile et corticale et une division symétrique dans la moitié des cas (Cowan and Hyman, 2006). Le rôle potentiel du complexe cycline A/CDK-2 au cours de la phase S chez l'embryon n'a pas encore été étudié, mais la déplétion de cycline A par ARNi n'entraîne pas de létalité embryonnaire (van der Voet et al., 2009).

1.2.4.2. La phase M

Comme lors de la méiose, CYB-1 et CYB-3 sont les cyclines essentielles qui coordonnent les événements de la phase M. La déplétion de CYB-3 entraîne un délai dans la formation, migration et centration des pronoyaux et dans la formation d'un fuseau bipolaire.

De plus, les chromatides sœurs ne se séparent pas et la cytokinèse est initiée, mais régresse dans plusieurs cas, donnant lieu à des fuseaux multipolaires aux divisions suivantes. Les embryons déplétés de CYB-1 présentent quant à eux une perte de condensation de leurs chromosomes, mais leur ségrégation se fait sans délai apparent. Par contre, de multiples noyaux sont visibles en méiose et en mitose et la quantité d'ADN varie considérablement d'un noyau à l'autre. La co-déplétion de CYB-1 et CYB-3 résulte en un arrêt dans le cycle cellulaire avant l'initiation de la phase M, démontrant que ces deux cyclines ont des fonctions essentielles lors de la progression mitotique. Encore une fois, la perte des cyclines B CYB-2.1 et CYB-2.2 n'entraîne pas de défauts de cycle cellulaire et peut largement être compensée par la présence de CYB-1 et CYB-3 lors de la première division embryonnaire. Il est toutefois important de noter que seule la perte des quatre cyclines CYB-1, CYB-3, CYB-2.1 et CYB-2.2 phénocopie une perte de CDK-1, avec une absence totale de ségrégation des chromosomes en méiose. Ceci suggère que CYB-2.1 et CYB-2.2 peuvent exercer des fonctions dans le cycle cellulaire (van der Voet et al., 2009).

Lors de la phase M au stade 2 cellules, l'enrichissement de PLK-1 dans AB par rapport à P1 constitue le troisième mécanisme régulant l'asynchronie de la deuxième division. Il est indépendant de la taille des blastomères ou de ATL-1 et CHK-1, mais dépendant des déterminants de la polarité, notamment de MEX-5/6. Plk1, via son domaine polo box, lie les protéines MEX-5/6 préalablement phosphorylées par la kinase MBK2, suivant ainsi leur localisation au pôle antérieur, puis dans la cellule AB. Il a été proposé que cette distribution asymétrique de PLK-1 promeuve l'accumulation nucléaire de CDC-25 plus rapidement chez AB que chez P1, et donc une entrée en mitose plus précoce chez AB que chez P1 (Rivers 2008). Une faible déplétion de PLK-1 permet le passage à travers les divisions méiotiques et mitotiques, mais retarde l'entrée en mitose plus dramatiquement chez la cellule P1. Un phénotype similaire est observé lors de la déplétion partielle de CDC-25, suggérant que la quantité des régulateurs mitotiques est abondante dans AB, mais limitante dans P1 (Budirahardja and Gönczy, 2008; Nishi et al., 2008; Rivers et al., 2008).

1.2.5. Les régulateurs mitotiques peuvent directement réguler la polarité.

Chez d'autres espèces, il est intéressant de constater que des régulateurs du cycle cellulaire peuvent cibler les protéines de la polarité ou affecter la polarité probablement indépendamment de leurs effets dans la progression du cycle cellulaire.

La première évidence qu'un régulateur du cycle cellulaire puisse contrôler la polarité provient d'une étude de 2001 de Tio et ses collègues qui montrèrent qu'un allèle dominant négatif de Cdk1 pouvait convertir la division asymétrique du neuroblaste embryonnaire de la *Drosophile* en une division symétrique, formant ainsi deux neurones identiques. Il est intéressant de noter que la nature thermosensible de l'allèle a permis de déterminer qu'il existait un niveau seuil d'activité de Cdk1 permettant de maintenir son rôle dans la progression du cycle cellulaire, mais interférant avec la polarité apico-basale du neuroblaste (Tio et al., 2001).

Chez *S. cerevisiae*, Cdk1/Cdc2 promeut la polarisation du cytosquelette d'actine et le site d'émergence du nouveau bourgeon en fin de phase S en activant la GTPase Cdc42. Cette activation passe par la phosphorylation de multiples protéines associées à Cdc24, la GEF qui active Cdc42. Une diminution de l'activité de Cdk1 entraîne une perte de phosphorylation et de localisation du complexe Cdc24 (McCusker et al., 2007).

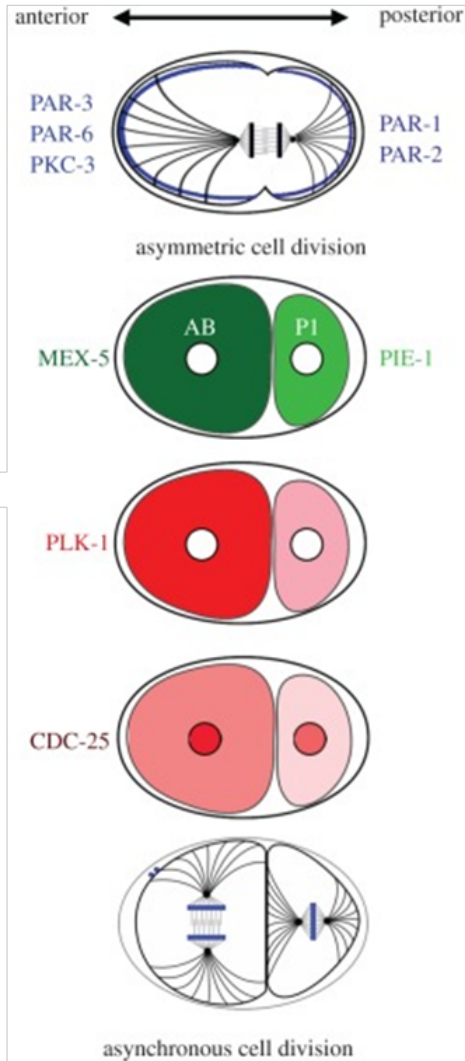
CDK-1 a aussi un rôle dans la polarité chez *C. elegans* où il participe au positionnement asymétrique du fuseau mitotique en métaphase, peut-être en promouvant la phosphorylation de LIN-5 par aPKC (voir section 1.1.2.3) (Galli et al., 2011; McCarthy Campbell et al., 2009). Toujours chez *C. elegans*, SPAT-1, l'orthologue de Bora a été identifié par Labbé et ses collègues lors d'un crible génétique visant à trouver les suppresseurs de la létalité associée à la perte de PAR-2 chez les mutants thermosensibles *par-2(it5ts)* (Labbé et al., 2006). L'enrichissement de SPAT-1 au pôle postérieur dépend de sa dégradation à l'antérieur, laquelle est initiée par la phosphorylation de PLK-1. Tel que mentionné précédemment, PLK-1 est quant à lui restreint à l'antérieur par un mécanisme dépendant de PAR-1. Au postérieur, SPAT-1 régule la localisation corticale de PAR-2, et la déplétion de PLK-1 ou de SPAT-1 permet de relocaliser PAR-2 au cortex chez les mutants *par-2(it5ts)*. Chez les embryons de type sauvage, la perte de PLK-1 ou de SPAT-1 génère aussi des défauts

de polarité et de cycle cellulaire tel qu'une localisation anormale des protéines PAR, un fuseau mitotique instable et la progression en anaphase en absence de cytokinèse préalable lors de la deuxième mitose (Noatynska et al., 2010) (Figure 1.9).

Bien que Bora/SPAT-1 soit un activateur connu d'Aurora A chez la Drosophile, l'homologue d'Aurora A, AIR-1, ne semble pas agir avec PLK-1 et SPAT-1 dans la polarité. En effet, sa déplétion partielle ne supprime pas la létalité et les défauts de polarité chez les mutants *par-2(it5ts)* et elle entraîne des phénotypes de cycle cellulaire et de polarité différents chez les embryons de type sauvage (Hannak et al., 2001; Noatynska et al., 2010; Schumacher et al., 1998). Le rôle de AIR-1 dans la polarité pourrait être une conséquence directe de son rôle dans la maturation du centrosome puisque l'absence de microtubule asexés corrèle parfaitement avec une perte de la polarité chez les embryons déplétés de AIR-1 (Wallenfang and Seydoux, 2000).

Chez la Drosophile, Plk1 et Aurora A sont aussi impliqués dans la polarité, mais leur rôle fait intervenir la régulation de substrats différents. Wirtz-Peitz et ses collègues ont démontré que l'établissement de la polarité chez le neuroblaste (et les cellules SOP) se fait de façon coordonnée pendant le cycle cellulaire, faisant intervenir successivement la formation d'un complexe inactif formé de Par6/aPKC/Lgl, sa dissociation puis la formation d'un complexe actif Par6/aPKC/Par3 où aPKC phosphoryle Numb, l'excluant ainsi du cortex apical. Ces événements sont initiés en mitose, avec la phosphorylation du domaine PB1 de Par6 par Aurora A. Il s'en suit une dissociation de Par6 et d'aPKC au sein du complexe Par6/aPKC/Lgl. aPKC alors actif phosphoryle Lgl, permettant son remplacement par Par3, ce qui mène à la formation d'un complexe Par6/aPKC/Par3 actif au pôle apical. (Wirtz-Peitz et al., 2008). Plk1 cible quant à lui Partner of Numb (Pon) renforçant ainsi la localisation basale de Numb (Wang et al., 2007a) (Figure 1.9).

(a)



(b)

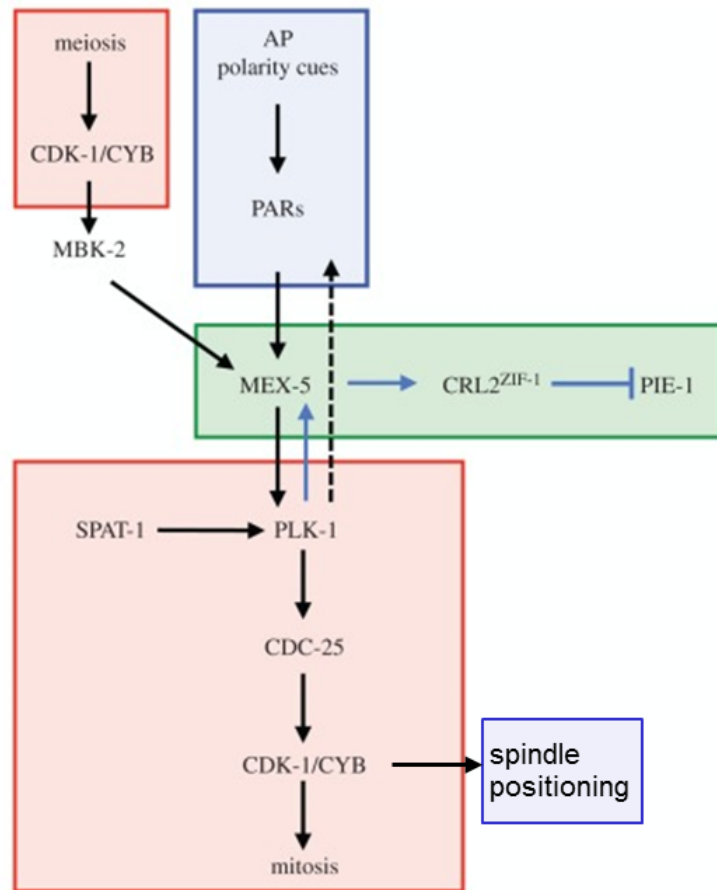
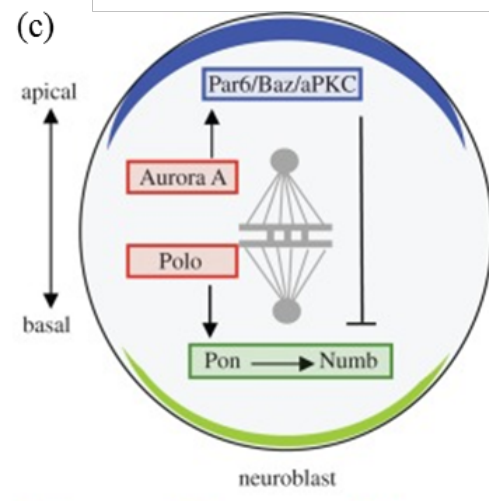


Figure 1.9 Les régulateurs du cycle cellulaire impliqués dans la polarité chez la *Drosophila* et *C. elegans*

(c)



(a) Représentation schématique des deux premières divisions de l'embryon. La localisation asymétrique de certains régulateurs mitotiques et des déterminants cellulaires coordonne la progression du cycle cellulaire avec l'acquisition du destin cellulaire. (b) Diagramme représentant les interactions entre les protéines régulant le cycle cellulaire (boîtes rouges), l'établissement et le maintien de la polarité (boîtes bleues) et le destin cellulaire (boîte verte). (c) Représentation schématique de la division du neuroblaste. Le même code de couleurs s'applique pour montrer les liens unissant les régulateurs du cycle cellulaire à ceux de la division asymétrique.

Figure adaptée avec permission, provenant de (Noatynska et al., 2013). Lien vers la licence : <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

1.2.6. Des défauts du cycle cellulaire peuvent indirectement affecter la polarité chez *C. elegans*

Tel que mentionné précédemment, la polarité de l'embryon de *C. elegans* n'est pas établie directement après l'entrée du spermatozoïde, mais fait suite à la complétion des deux phases de méiose maternelle. La régulation temporelle séparant la complétion de la méiose maternelle et l'initiation de la polarité corticale par le centrosome paternel est cruciale au déroulement de la division asymétrique. De façon intéressante, plusieurs études ont montré une corrélation entre un délai dans le cycle cellulaire méiotique et une perte de la polarité normale de l'embryon, par exemple chez embryons déplétés de CUL-2 et ZYG-11.

Chez ces embryons, un délai d'environ 50 minutes est observé en progression de méiose II avec persistance du fuseau méiotique, suggérant que ce délai est attribuable au rôle essentiel du complexe E3 ligase CUL-2^{ZYG-11} dans la dégradation des cyclines CYB-1 et CYB-3 lors de la transition métaphase-anaphase. La déplétion de chacune des cyclines supprime partiellement ces défauts, alors que la déplétion de CDK-1 les supprime complètement et la sortie de la méiose se fait sans ségrégation des chromosomes (Sonneville and Gönczy, 2004). Les embryons déplétés de CUL-2 ou ZYG-11 ont aussi des défauts de polarité avec la présence de PAR-2 au cortex antérieur ou latéral. Cette localisation ectopique persiste durant le cycle cellulaire et résulte en une inversion ou une perte de polarité. En effet, la distribution des déterminants cellulaires postérieurs tel que PIE-1 et les P granules suit celle de PAR-2, donnant lieu à des embryons qui se divisent soit de façon asymétrique, mais avec une polarité inversé ou de façon symétrique (Liu et al., 2004; Sonneville and Gönczy, 2004). Le lien de causalité entre le délai méiotique et ces défauts de polarité reste pourtant controversé. En effet la localisation anormale de PAR-2 pourrait être attribuable à des facteurs en lien avec un effet indirect du délai du le cycle cellulaire dans la polarité ou à un rôle plus direct de CUL-2 ou ZYG-11 dans la polarité.

En accord avec la première possibilité, il a été démontré qu'une stabilisation prolongée du fuseau méiotique (presque trois fois plus longue que la normale) corrèle avec l'apparition de domaines ectopiques de PAR-2 (Liu et al., 2004; Wallenfang and Seydoux, 2000) (Figure 1.10). De plus, tel que mentionné précédemment, PAR-2 peut lier les microtubules et les

utiliser pour joindre le cortex lors de l'établissement de la polarité par le MTOC du centrosome paternel (Motegi et al., 2011; Zonies et al., 2010). Un mécanisme semblable pourrait donc être mis en place par le fuseau méiotique dépourvu de centrosome dans l'initiation d'une polarité inversée lors du délai méiotique. Un croissant cortical transitoire de PAR-2, dépendant des microtubules, est d'ailleurs retrouvé chez les embryons de type sauvage, à l'endroit où s'est effectuée la méiose maternelle (Tsai and Ahringer, 2007). En accord avec la deuxième possibilité, il a été suggéré que CUL-2, mais pas ZYG-11, renforce l'extension du domaine ectopique de PAR-2 (Liu et al., 2004). Aussi, le mouvement anormal du centrosome paternel vers le croissant ectopique de PAR-2 à l'antérieur chez les embryons déplétés de *zyg-11*, pourrait contribuer à renforcer l'établissement d'une polarité inversée (Sonneville and Gönczy, 2004).

Il est intéressant de noter que la perte du complexe APC, qui régule la progression en méiose I, a elle aussi des conséquences délétères sur la polarité. Des mutants pour les sous-unités de ce complexe, incluant *mat-2*, *mat-3*, *mat-1*, *emb-27*, *emb-30*, complètent leur méiose en 65 min contre 29 min chez les embryons sauvages et présentent des défauts de polarité similaires à ceux des mutants *cul-2* (Wallenfang and Seydoux, 2000) (Golden et al., 2000). Chez ces embryons, la localisation ectopique de PAR-2 corrèle avec celle du fuseau méiotique lors de l'arrêt prolongé en métaphase de méiose I (Figure 1.10). Pourtant, encore une fois, il demeure incertain que le rôle du complexe APC dans la polarité soit uniquement la conséquence d'un délai dans la progression méiotique. En effet, selon les études, la corrélation entre le temps du délai et la sévérité des défauts de polarité est parfois contradictoire chez les embryons mutants pour le complexe APC ou pour le complexe CUL-2^{ZYG-11}. De plus, l'absence de stabilisation du fuseau méiotique lors de la déplétion de *cdk-1* empêche la formation d'une polarité inversée chez les mutants *mat-1*; mais n'abolit pas complètement la localisation antérieure de GFP::PAR-2 chez les mutants *zyg-11* (Rappleye et al., 2002; Shakes et al., 2003; Sonneville and Gönczy, 2004; Starostina et al., 2007; Wallenfang and Seydoux, 2000). Ces disparités montrent bien la difficulté de déterminer si les des régulateurs du cycle cellulaire ont un rôle spécifique ou indirect dans la polarité.

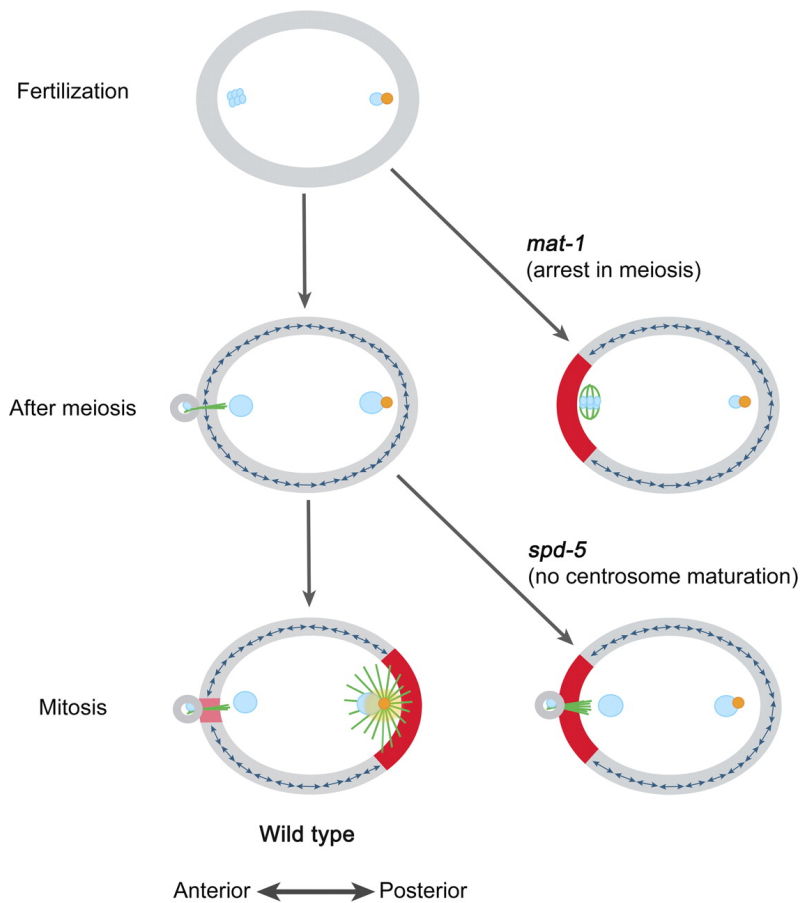


Figure 1.10 Modèle d'initiation d'une polarité corticale par le fuseau méiotique du zygote de *C. elegans*.

Représentation schématique de la localisation corticale de PAR-2 (en rouge) chez des embryons sauvage ou chez des mutants *spd-5* et *mat-1*. En absence de progression dans le cycle cellulaire ou en absence d'un centrosome fonctionnel, PAR-2 n'est pas établi au cortex postérieur et joint le cortex antérieur, probablement en liant les microtubules du fuseau méiotique. Il en résulte l'établissement d'une polarité inversée. Les globules polaires extrudés lors de la méiose sont représentés par des cercles gris, le pronoyau maternel et le pronoyau paternel par des cercles bleus avec le centrosome paternel en orange et les microtubules en vert. Figure recopiée avec permission, provenant de (Motegi and Seydoux, 2007) Copyright © 2015 by The Rockefeller University Press. Lien vers la licence : <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

1.3. Premier objectif de recherche

Chez *C. elegans*, les principaux évènements de la division asymétrique sont établis en relation étroite avec le cycle cellulaire dès la première division. De plus, plusieurs régulateurs mitotiques semblent aussi intervenir dans la polarité. Cependant, en absence d'évidences d'une régulation spécifique des protéines de la polarité par ces régulateurs mitotiques, le mécanisme de leur intervention reste ambigu. En effet, certaines études montrent qu'il est concevable que l'effet délétère d'une perte des régulateurs du cycle cellulaire sur la polarité soit peu spécifique et plutôt attribuable à une perte du couplage entre établissement de la polarité et progression du cycle cellulaire.

CYB-2.1 et CYB-2.2 sont de parfaits candidats pour déterminer la contribution réelle des régulateurs du cycle cellulaire dans la division asymétrique. Tout comme pour SPAT-1, ces deux cyclines de type B ont été identifiées comme supprimeurs de la létalité de *par-2(it5ts)* lors du crible de Labbé et ses collègues (Labbé et al., 2006). Par contre, contrairement à SPAT-1, leur perte n'engendre pas de défauts majeurs dans la progression du cycle cellulaire (Rabilotta et al 2015, Huevel 2009). J'ai entrepris de caractériser le rôle de ces cyclines dans la division asymétrique de l'embryon pour évaluer la dualité de fonctions d'un régulateur mitotique dans la polarité et le cycle cellulaire.

1.4. Division asymétrique extrinsèque

Chez les eucaryotes multicellulaires, certaines cellules telles que les cellules sanguines ou les spermatozoïdes sont fréquemment remplacés au cours de la vie de l'individu. L'homéostasie au sein des tissus et la production des gamètes est assurée par des cellules souches somatiques ou germinales. Les cellules souches sont définies comme des cellules ayant des propriétés distinctes incluant une capacité de proliférer, de générer les différents types de cellules différenciées du tissu auquel elles appartiennent et de s'autorenouveler pour assurer leur maintien. En 1978, Schofield postule que les propriétés des cellules souches hématopoïétiques leur sont conférées par leur microenvironnement, la moelle osseuse, en proposant l'hypothèse de la niche (Schofield, 1978). Depuis, plusieurs niches régulant l'identité et le comportement des cellules souches ont été identifiées dans divers tissus et organismes.

Alors que la composition exacte de la niche est difficile à déterminer chez les mammifères, à cause de leurs structures anatomiques complexes, les niches des lignées germinales de *C. elegans* et de la *Drosophile* ont été parmi les premières à être caractérisées. Leur visualisation *in situ* a permis d'observer deux mécanismes permettant de maintenir un nombre fixe de cellules souches chez un organisme adulte; la limitation de l'espace de la niche et la division asymétrique extrinsèque. Dans ce type de division, l'orientation de l'axe de division de la cellule mère par rapport à la niche est critique. Il permet de positionner les deux cellules filles, à priori intrinsèquement identiques, dans des microenvironnements différents, ce qui leur confèrera des destins distincts. La cellule qui garde contact avec la niche maintient son identité de cellule souche alors que la cellule qui perd ce contact entame le programme de différenciation (Figure 1.11). Ce mode de division garde donc le nombre de cellules souches constant en permettant une balance entre leur autorenouvellement et leur différenciation. La limitation de l'espace de la niche est aussi importante dans l'homéostasie des cellules souches. Chez *C. elegans* et la *Drosophile*, la niche établit des contacts directs avec les cellules souches germinales (CSGs) qui sont essentiels à la perception des signaux d'autorenouvellement (Song and Xie, 2002; Starich et al., 2014). La distance qui sépare la niche des cellules souches corrèle positivement avec leur degré de différenciation. Ainsi, l'organisation spatiale du système niche/cellules souches est primordiale (Yamashita et al., 2010).

Alors que la division asymétrique extrinsèque maintient la quantité de cellules souches constante, d'autres mécanismes doivent assurer leur production accrue lors de la régénération tissulaire ou lors de l'expansion initiale du bassin de cellules souches dans les stades précoces du développement. Dans ces cas, un mode de division symétrique peut être adopté par les cellules souches (Morrison and Kimble, 2006). La niche pourrait aussi modifier sa régulation pour assister le passage d'une phase de maintien à une phase de production des cellules souches et inversement (Rojas-Rios and Gonzalez-Reyes, 2014).

Différentes voies de signalisation sont spécifiques à la communication niche-cellules souches chez les différents organismes ou tissus. Pour les besoins de cette thèse, seuls les principaux aspects structurels du système niche/cellules souches chez la *Drosophila* seront décrits dans la section suivante, puis le modèle de *C. elegans* sera abordé plus en détail.

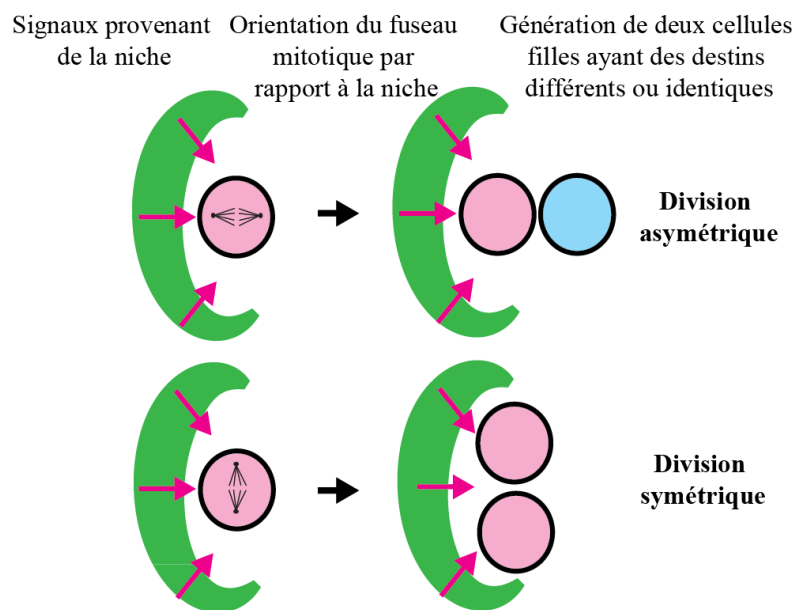


Figure 1.11 Représentation schématique d'une division asymétrique ou symétrique régulée par des facteurs extrinsèques.

La division asymétrique extrinsèque nécessite un positionnement du fuseau mitotique perpendiculaire à la niche, de telle sorte que les deux cellules filles formées après division baignent dans des microenvironnements différents. La niche est ici représentée par un croissant vert, l'état de cellule souche est représenté par la couleur rose alors que la progression vers un état différencié est représentée par la couleur orange. Les flèches roses schématisent les signaux d'autorenouveau envoyés par la niche.

1.4.1. Division asymétrique extrinsèque : les principaux modèles

1.4.1.1. La lignée germinale femelle de la *Drosophile*

Chez la *Drosophile*, le système niche/CSGs du germarium de l'ovaire fut le premier à être structurellement et fonctionnellement caractérisé et celui des testicules du mâle demeure l'un des plus étudiés.

Chez les femelles, la niche est formée de quatre à sept cellules de la coiffe (*cap cells*) qui contactent un maximum de deux à trois CSGs. Ces dernières sont enveloppées d'un autre type de cellule somatique; les cellules souches escortes qui supportent les cellules de la coiffe dans le maintien des CSGs (Xie and Li, 2007). La limitation spatiale de la niche est importante puisque le nombre de CSGs est étroitement lié au nombre de cellules de la coiffe (Xie and Spradling, 2000). Dans ce modèle, les CSG se divisent asymétriquement par rapport à leur niche et la cellule fille s'en éloignant se différencie en cystoblaste (Xie and Li, 2007). Ce dernier entreprend 4 cycles mitotiques sans cytokinèse lors d'une période d'amplification, générant un cyste à 16 cellules (Figure 1.12). Les cellules escortes transfèrent les cystoblastes et les cystes vers le pôle opposé du germarium en utilisant des extensions membranaires dynamiques (Kirilly et al., 2011; Morris and Spradling, 2011). Les cellules de la coiffe utilisent la voie de signalisation BMP (*bone morphogenetic protein*) pour maintenir les CSGs alors que celles-ci participent au maintien de leur niche par la voie de signalisation Notch. Les ligands transmembranaires du récepteur Notch, soit Delta et Serrate, sont exprimés par les CSGs et activent Notch dans les cellules de la coiffe. La perte du signal Notch résulte en une perte de la niche, et donc une perte subséquente des CSGs, alors qu'une augmentation du signal Notch forme de plus grosses niches (Ward et al., 2006). En plus de cette communication bidirectionnelle entre les cellules souches et la niche, une autre communication entre les cellules de la coiffe et les cellules escortes est établie en réponse aux changements du microenvironnement qui pourraient affecter le bassin des GSCs. En effet, les cellules de la coiffe étendent des extensions ou cytonèmes vers les cellules escortes pour leur transférer le ligand Hh (*Hedgehog*). Cette communication régulerait la production de facteurs de maintien de l'identité cellule souche par les cellules escortes (Rojas-Rios et al., 2012). La robustesse du système niche-cellules souches de la lignée germinale femelle fait donc intervenir une

transmission d'information localement ou à distance entre 3 types cellulaires distincts dans le but ultime de maintenir l'homéostasie au sein du germarium.

1.4.1.2. La lignée germinale mâle de la *Drosophile*

Chez les mâles, la niche des CSGs est constituée d'un regroupement circulaire de 8-16 cellules somatiques appelées cellules hub qui peuvent accommoder un espace suffisant pour s'entourer de 7 à 12 CSGs (Hardy et al., 1979). Les cellules hub utilisent la voie de signalisation JAK/STAT ainsi que la voie de signalisation BMP pour maintenir les cellules souches (Kiger et al., 2001; Tulina and Matunis, 2001). Chaque CSG est encapsulée par une paire de cellules souches somatique, les cellules progénitrices du cyste (CPC), qui soutiennent les fonctions de la niche dans le maintien de l'identité des CSGs (Leatherman and Dinardo, 2010; Lim and Fuller, 2012; Yamashita et al., 2010). Les CSGs mâles se divisent asymétriquement par rapport à leur niche, de façon à ce qu'une seule des deux cellules fille y reste associée alors que l'autre s'en éloigne et se différencie en gonioblaste. Chaque gonioblaste est encapsulé par deux cellules somatiques du cyste issus de la division d'une CPC. Au sein de ce microenvironnement, le gonioblaste entreprend 4 cycles de divisions mitotiques pour former un cyste à 16 cellules (Hardy et al., 1979; Yamashita et al., 2003) (Figure 1.12). Dans ce modèle, l'établissement d'un fuseau mitotique perpendiculaire à la niche dépend du positionnement stéréotypique du centrosome maternel au pôle apical, adjacent à la cellule hub, alors que le centrosome fille se déplace au pôle basal (Yamashita et al., 2003; Yamashita et al., 2007). Un point de contrôle d'orientation du centrosome prévient l'entrée en mitose tant que les centrosomes ne sont pas proprement orientés (Yuan et al., 2012). Yuan, Inaba et leurs collègues ont montré que ce point de contrôle dépend des protéines PAR-3 et PAR-1. Brièvement, PAR-1 se localise au spectrosome, un organite de type réticulum endoplasmique, et y séquestre la cycline A pour prévenir l'entrée en mitose avant que les centrosomes ne soient correctement positionnés. PAR-3 forme des micro-domaines (*patches*) à l'interface entre les CSGs et la niche, lesquels serviront de plateforme pour l'ancrage du centrosome juste avant l'entrée en mitose. Enfin la phosphorylation de PAR-3 par PAR-1 est importante pour le point de contrôle des centrosomes (Inaba et al., 2015; Yuan et

al., 2012). Ainsi, comme dans la division asymétrique intrinsèque, les protéines PAR jouent un rôle dans la division asymétrique extrinsèque et peuvent contrôler certains aspects du cycle cellulaire pour les coordonner à la polarité cellulaire.

De façon commune aux modèles mâle et femelle, la formation de jonctions adhérentes entre les cellules de la niche et les CSGs est essentielle au maintien de celles-ci et la perte de la cadherine E, notamment lors du vieillissement, entraîne une perte des GSCs (Song and Xie, 2002). Le remplacement des CSGs est aussi souvent assuré par deux mécanismes, l'un étant la division symétrique d'une CSG via l'établissement d'un fuseau parallèle à la niche (Sheng and Matunis, 2011; Xie and Spradling, 2000) et l'autre étant la réversion d'un cyste différencié (Brawley and Matunis, 2004; Kai and Spradling, 2004). Ainsi, les cellules germinales gardent leur potentiel de cellule souche même lorsqu'elles entament leur différenciation, suggérant que leur division asymétrique et leur identité ne sont dictées que par le microenvironnement où elles se trouvent.

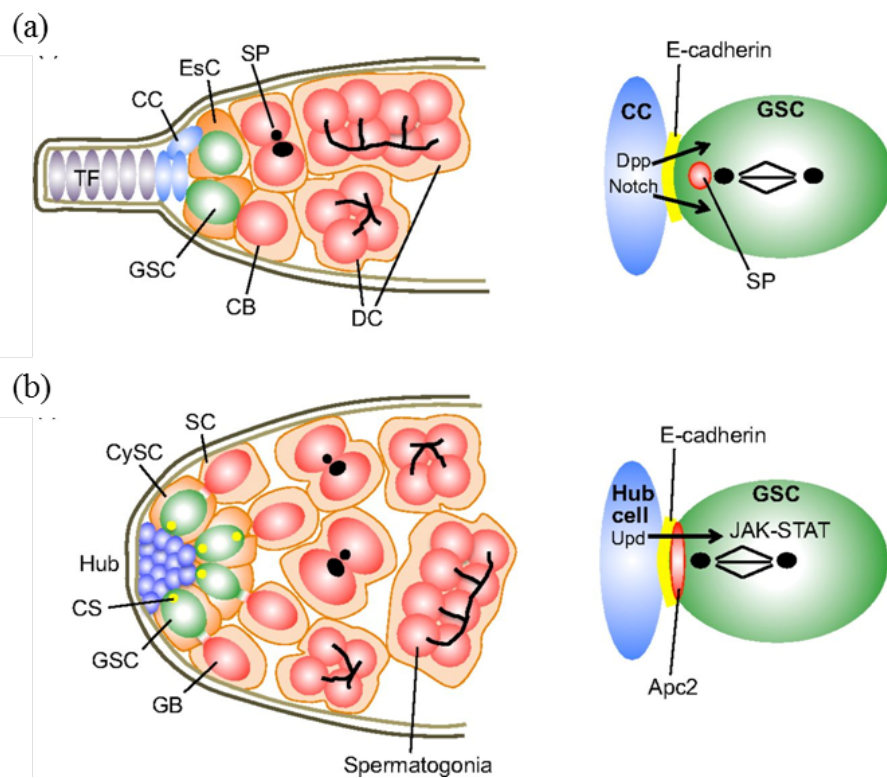


Figure 1.12 Division asymétrique extrinsèque chez les lignées germinales femelle et mâle de la Drosophile.

(a) Anatomie des structures entourant la niche (les cellules de la coiffe, *cap cells* en bleu) et les CSGs (en vert) au sein de la lignée germinale femelle. Les cellules colorées en rouge ont entamé le processus de différenciation. (b) Schéma représentant l'anatomie des structures entourant la niche (les cellules Hub en bleu) et les CSGs (en vert) au sein de la lignée germinale mâle. Les cellules colorées en rouge ont entamé le processus de différenciation.

À gauche de chaque lignée germinale, femelle et mâle, est représentée la division asymétrique d'une CSG avec la mention des voies de signalisation impliquées dans leur autorenouveaulement. Au sein des deux modèles, les cellules souches positionnent leur fuseau mitotique perpendiculairement à la niche lors de la division asymétrique.

CC : cellules de la coiffe (*cap cells*), GSC : cellules souches germinales (*germline stem cell*), CB : cystoblaste, TF : *terminal filament*, SP : spectrosoime, DC : cyste en développement, GB : gonioblaste (*gonialblast*), CySC : cellules progénitrices du cyste (*cyst stem cells*), SC: cellules somatiques du cyste, CS : centrosome, Apc2: *Adenomatous polyposis coli protein*, EsC : cellules souches escortes (*escort stem cells*), Figure recopiée avec permission, provenant de (Shim et al., 2013).

1.4.2. La lignée germinale de *C. elegans*

Les quelques études ayant utilisé l'imagerie *in vivo* dans les modèles de la Drosophile (Morris and Spradling, 2011; Sheng and Matunis, 2011) ont révélé plusieurs informations sur l'orientation des divisions des cellules souches par rapport à leur niche. La lignée germinale de *C. elegans* apparaît toutefois comme un modèle plus avantageux pour étudier la communication niche/cellules souches *in vivo*. Les vers adultes sont transparents et il est donc possible de visualiser les divisions des cellules germinales sans dissection préalable. De plus, les changements dans la morphologie de la niche et le comportement des cellules souches entre les stades larvaires et adulte permettraient d'étudier l'évolution de cette communication au cours du développement.

1.4.2.1. Formation de la lignée germinale et de la gonade somatique

La lignée germinale de *C. elegans* est fondée par la cellule germinale primordiale P₄ de l'embryon. Lors de la gastrulation, P₄ se divise symétriquement pour former deux cellules progénitrices germinales, Z₂ et Z₃, qui demeurent mitotiquement quiescentes jusqu'à la moitié du premier stade larvaire L1 (Sulston et al., 1983) (Figure 1.13). Z₂ et Z₃ sont entourées de Z₁ et Z₄, les deux précurseurs de la gonade somatique (PGS). En présence de nourriture suffisante, la jeune larve évolue successivement à travers les stades L1, L2, L3, L4 et adulte.

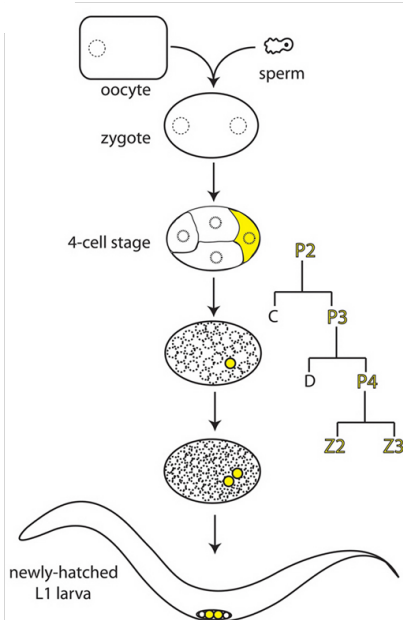


Figure 1.13 Formation de la lignée germinale chez *C. elegans*.

Représentation schématique de la provenance des deux cellules progénitrices germinales Z₂ et Z₃ (en jaune) formés par divisions des blastomères de la lignée P qui sont les précurseurs de la lignée germinale (aussi en jaune). P1 et P3 ne sont pas représentés dans ce schéma. Figure recopiée avec permission, provenant de (Hubbard and Greenstein, 2005) © wormbook.org. Lien vers la licence : <https://creativecommons.org/licenses/by/2.5/>

Durant les stades larvaires, les cellules germinales prolifèrent extensivement par divisions mitotiques, faisant passer leur nombre de 2 au stade L1 à ~2000 chez l'hermaphrodite adulte. Ce nombre est ensuite maintenu de façon constante chez l'adulte, alors que les cellules souches et progéniteurs germinaux (CSPG) continuent leurs divisions mitotiques pour soutenir la production continue d'ovocytes. Les cellules germinales sont réparties en deux populations similaires au sein des deux bras de la gonade, qui sont des tubes en forme de U joints au centre par l'appareil utérin (Kimble and Hirsh, 1979) (Figure 1.14). Dès les premiers stades larvaires, les cellules germinales ne sont pas complètement individualisées et chaque noyau est entouré d'une membrane baso-latérale partiellement ouverte sur un rachis central commun (Amini et al., 2014; Hall et al., 1999; Hirsh et al., 1976). Cependant, ce syncytium ne permet pas de synchroniser les divisions des cellules souches, probablement parce que la petite taille des ouvertures ne permet qu'un échange limité de cytoplasme entre cellules voisines. Des divisions simultanées chez des groupes de 2 à 10 cellules rapprochées sont tout de même observables, mais leur régulation demeure inconnue (Maciejowski et al., 2006).

Le développement de la gonade somatique est coordonné à celui de la lignée germinale avec Z_1 et Z_4 générant 12 descendants au stade L2. Ceux-ci incluent deux *distal tip cells* (DTCs), chacune localisée à l'une des deux extrémités distales de la gonade pour former la niche des CSPG, 4 cellules SS (*spermatheca/sheath*) précurseurs de la spermathèque et des cellules *sheath*, 5 précurseurs l'appareil utérin (les cellules DU/VU) ainsi qu'une cellule AC (*anchor cell*) qui régule le développement de la vulve (Kimble and Hirsh, 1979). La spécification du destin des deux DTC formant la niche fait suite à une division asymétrique sous contrôle de la voie Wnt/ β caténine et mène ultimement à l'expression du facteur de transcription *ceh-22/Nkx2.5* dans la future DTC. La déplétion ou l'augmentation de l'expression de la β caténine ou de *ceh-22* entraîne respectivement la perte ou à la formation de DTCs surnuméraires (Kidd et al., 2005; Lam et al., 2006; Phillips et al., 2007; Siegfried and Kimble, 2002)

L'adulte de *C. elegans* existe aussi comme mâle, lequel possède un seul chromosome sexuel X par rapport à deux chez l'hermaphrodite. Chez le mâle, Z_2 et Z_3 prolifèrent similairement à ce qui est observé chez les hermaphrodites, mais assurent uniquement la

production continue de spermatozoïdes (Morgan et al., 2010). Toujours chez le mâle, Z_1 et Z_4 se divisent pour former la gonade somatique, générant 10 descendants au stade L2. Ces derniers incluent deux DTCs qui forment la niche des CSPG, 3 cellules précurseurs du canal déférent, 4 précurseurs de la vésicule séminale ainsi qu'une cellule LC ou *linker cell* (Hirsh et al., 1976). Cette dernière permet l'élongation de la gonade, une fonction normalement assurée par les DTCs chez l'hermaphrodite. Les deux DTCs mâles sont localisées à l'extrémité distale de l'unique bras de la gonade, un tube en forme de J contenant ~1000 cellules germinales (Kimble and Hirsh, 1979).

Ainsi, chez l'adulte, la production des gamètes s'organise de façon linéaire et séquentielle dans l'axe distal-proximal de la gonade. La région la plus distale, près de la niche, est appelée zone mitotique et comprend ~200 CSPG qui maintiennent leur capacité à proliférer de façon mitotique. Suite à leur déplacement vers la région proximale, les noyaux entrent dans une zone de transition au sein de laquelle sont encore retrouvés quelques cellules mitotiques, mais aussi des cellules en prophase méiotique (aux stades leptotène et zygotène) qui sont facilement reconnaissables par l'organisation polarisée, en forme de croissant, de leur ADN. Enfin la progression méiotique en pachytène puis en diakinèse, dans la région de la boucle, mène à la formation des gamètes dans la région la plus proximale (Crittenden et al., 2006; Killian and Hubbard, 2005; Kimble and Hirsh, 1979). Chez les deux sexes, c'est au milieu du stade L3 qu'apparaissent les premières cellules méiotiques à l'extrémité proximale du bassin des CSPG en pleine expansion (Figure 1.14). Il a été proposé que l'atteinte d'une distance critique séparant la niche des CSPG les plus proximales promeut l'entrée en méiose de celles-ci (Killian and Hubbard, 2005; Kimble and White, 1981; Voutev et al., 2006). Chez l'hermaphrodite, les cellules méiotiques se différencient d'abord en quelque 300 spermatozoïdes jusqu'au stade L4 puis en gamètes femelles pour le reste de la vie adulte (Ward and Carrel, 1979). La majorité des cellules germinales (30 cellules germinales pour 1 ovocyte formé) entreront en apoptose dans la région pachytène chez l'adulte, agissant ainsi probablement comme cellules nourricières (Jaramillo-Lambert et al., 2007; Wolke et al., 2007). Les spermatozoïdes sont limitants pour la quantité de progéniture formée et sont stockés dans la spermathèque, un organe par lequel tous les ovocytes doivent nécessairement passer lors de l'ovulation, assurant ainsi leur fertilisation (Kimble J, 1988)

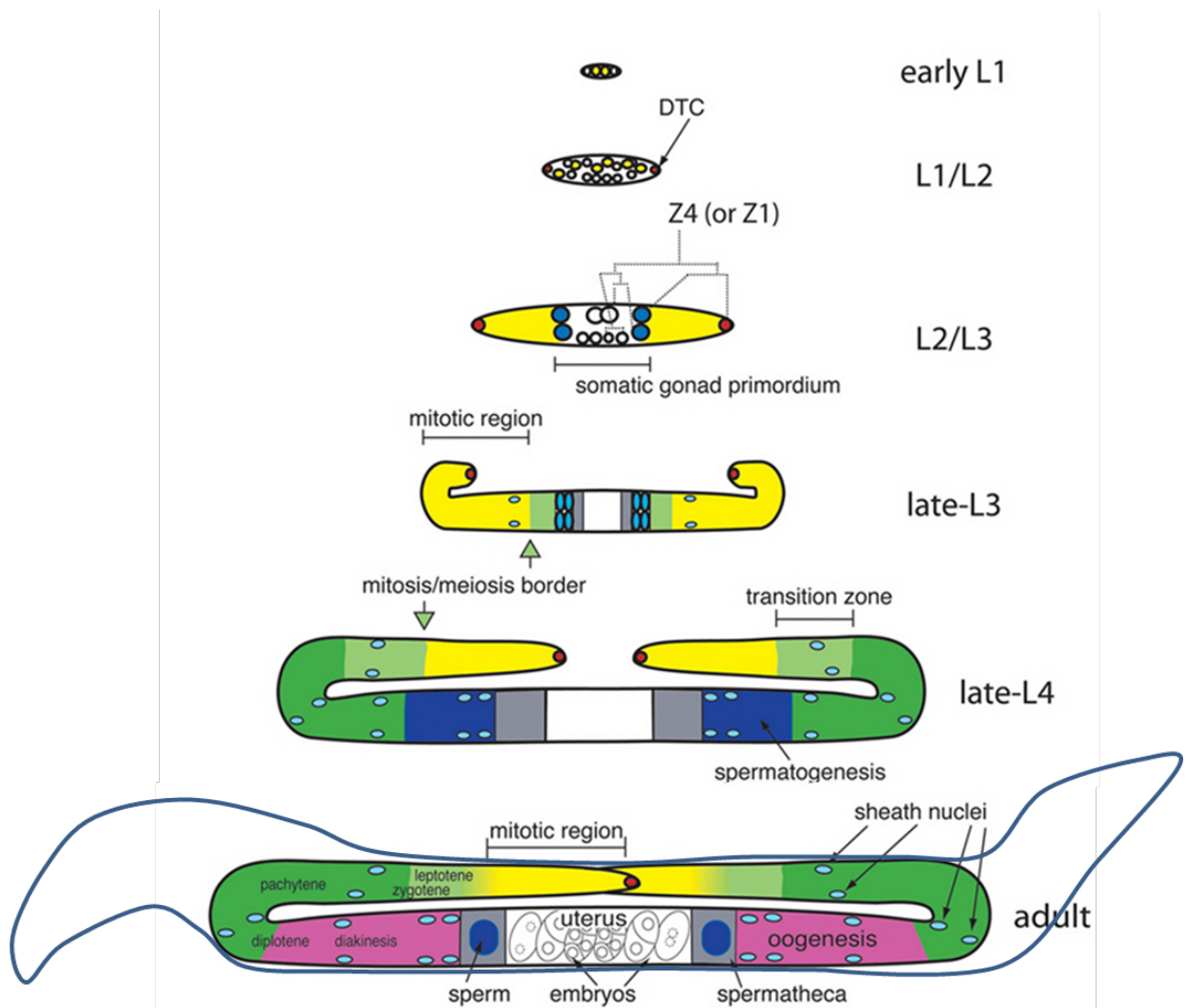


Figure 1.14 Représentation schématique du développement de la gonade somatique et germinale aux stades larvaires et adulte.

Le stade de développement correspondant à chaque gonade est indiqué à droite. La gonade somatique inclue la DTC, (cercles rouges), les précurseurs SS (cercles bleu foncés), les cellules *sheath* (cercles bleus pâle), la spermatheque (en gris) et l'utérus (en blanc). Les cellules de la gonade somatique sont représentées par leurs noyaux, ce qui rend compte de leur position, mais pas de leur morphologie réelle. La gonade germinale inclut les CSPG de la zone mitotique (en jaune), les cellules en début de prophase méiotique de la zone de transition (en vert pâle), les cellules au stade pachytène dans la région de la boucle (en vert foncé), les cellules complétant leur spermatogénèse (en bleu) et celles complétant l'ovogénèse (en rose). Les différents stades de progression méiotique sont indiqués. La taille de la gonade à différents stades n'est pas à l'échelle. La forme approximative du vers n'est ici représentée qu'au stade adulte. Figure adaptée avec permission, provenant de (Hubbard and Greenstein, 2005) © wormbook.org. Lien vers la licence : <https://creativecommons.org/licenses/by/2.5/>

Chez l'hermaphrodite, la détermination du sexe des gamètes est un processus qui prend déjà place dans la partie proximale de la zone mitotique et qui est indépendant de la décision d'entrer en méiose (Morgan et al., 2013). Brièvement, elle dépend de signaux provenant du soma, tel que le signal pro-spermatogénèse médié par HER-1 (Perry et al., 1993), et de régulateurs qui répondent à ces signaux au sein de la lignée germinale, tel que le récepteur TRA-2, inhibé par HER-1 (Kuwabara and Kimble, 1995; Kuwabara et al., 1992; Okkema and Kimble, 1991). TRA-2 inactive à son tour les protéines FEM pro-spermatogénèse en liant et inactivant FEM-3. Sans cette inhibition, le complexe CUL-2 E3 ligase CBC^{FEM-1} utilisant FEM-2 et FEM-3 comme cofacteurs dégraderait TRA-1, une protéine à domaines ankyrines répétés (Starostina et al., 2007). TRA-1 réprime la transcription de *fog-1* et *fog-3*, les deux régulateurs en aval de la voie qui inhibent la production d'ovocytes et permettent la spermatogénèse (Chen and Ellis, 2000; Jin et al., 2001). Ainsi, les hermaphrodites portant des mutations gain de fonction dans les gènes *fog-1*, *fog-3* ou *fem-3* produisent continuellement des spermatozoïdes. D'autres protéines régulent à la fois la décision mitose/méiose et la décision spermatozoïde/ovocyte telle que GLD-1, qui réprime la traduction de *tra-2*, ou NOS-3, FBF-1 et FBF-2 qui répriment celle de *fem-3* (revu dans (Ellis and Schedl, 2007)).

Plusieurs résultats montrent que la DTC agit comme une niche pour les CSPG durant la spermatogénèse ou l'ovogenèse au sein des deux sexes. D'une part, des expériences d'ablation de la DTC montrent qu'elle est nécessaire au maintien de la région de prolifération mitotique (Kimble and White, 1981). D'autre part, la localisation ectopique ou la duplication de la DTC entraîne respectivement un changement d'emplacement correspondant ou la formation d'une nouvelle zone de prolifération des CSPG près de la seconde niche (Kidd et al., 2005; Kipreos et al., 2000; Kostic et al., 2003). Enfin, la voie de signalisation canonique Notch, qui est nécessaire et suffisante au maintien de la zone mitotique, est activée par le ligand de type Delta/Serrate-like/LAG-2 (DSL), LAG-2, qui est exprimé par la DTC, alors que le récepteur Notch, GLP-1, est exprimé par les CSPG (Figure 1.15). En absence de la DTC ou de GLP-1, toutes les CSPG se différencient et la zone mitotique est entièrement perdue (Crittenden et al., 1994; Fitzgerald and Greenwald, 1995; Henderson et al., 1994). D'autres voies de signalisation interviennent aussi dans l'expansion du bassin de CSPG pendant les stades

larvaires. Celles-ci incluent la voie TGF β qui, similairement à la voie Notch, maintient l'identité des cellules souches sans affecter leur cycle cellulaire alors que la voie du récepteur de l'insuline (DAF-2) promeut l'expansion des CSPG en stimulant leurs divisions. Enfin, d'autres cellules de la gonade somatique, les cellules *sheath*, stimulent la prolifération des CSPG durant la phase d'expansion (Dalfo et al., 2012; McCarter et al., 1997; Michaelson et al., 2010).

1.4.2.2. Interactions entre la niche et les cellules souches au cours du développement

Durant la période larvaire, les CSPG prolifèrent avec un index mitotique plus élevé que chez l'adulte (11.4% chez les L4 contre 3.4-4.3% chez les adultes), probablement à cause d'un cycle cellulaire plus court puisqu'il n'y a pas de CSPG quiescentes chez *C. elegans*. La durée du cycle cellulaire est estimée à 4h chez les larves L2 contre 20 h chez les adultes (même si cette valeur est surestimée selon une étude de (Fox et al., 2011)) (Crittenden et al., 2006; Gerhold et al., 2015; Kipreos et al., 1996; Maciejowski et al., 2006). La prolifération massive des CSPG fait passer leur nombre de ~20 à la transition L2/L3, à ~ 80 à la transition L3/L4, puis à ~200 à la transition L4/adulte (Killian and Hubbard, 2005). Au cours des stades larvaires, les cellules *sheath* agissent comme des cellules de support de la niche en contactant les CSPG et contribuant à leur prolifération par un mécanisme encore inconnu. La perte des cellules *sheath* ou celle de leurs précurseurs entraîne donc une diminution drastique du nombre de CSPG (Hall et al., 1999; Killian and Hubbard, 2005; Korta and Hubbard, 2010; McCarter et al., 1997; McGovern et al., 2009). C'est à la transition L2/L3 que les 4 précurseurs SS se divisent et donnent naissance à 4 cellules Sh1 qui forment les deux premières paires distales de cellules *sheath* différenciées, soit une paire par bras de gonade. Les 4 autres cellules issues de cette division sont les précurseurs Sh2-5/Spth qui formeront au stade L4 les 4 autres paires de cellules *sheath* proximales (Sh2-5) et la spermathèque. En raison de l'élongation de la gonade, ces cellules *sheath* proximales n'auront de contact qu'avec des cellules méiotiques chez l'adulte. Les paires distales Sh1 sont donc, avec la DTC, les seules cellules somatiques en contact avec les CSPG jusqu'au début du stade adulte et sont

les seules cellules importantes pour la prolifération des CSPG pendant les stades larvaires (Hall et al., 1999; Killian and Hubbard, 2005) (Figure 1.14).

Cette coordination spatio-temporelle entre la différenciation de lignée germinale et le développement de la gonade somatique est cruciale. Un délai dans l'entrée méiotique ou une perte de l'élongation normale de la gonade génère un contact inapproprié entre les paires proximales de cellules *sheath* différenciées et les CSPG. Ceci a pour conséquence la formation de cellules en prolifération dans la gonade proximale, générant ainsi une condition appelée tumeur proximale (Pepper et al., 2003a; Pepper et al., 2003b) (Figure 1.16). Ces tumeurs dépendent de l'expression par les cellules *sheath* proximales des ligands de la famille DSL APX-1 et ARG-1 qui activent le récepteur Notch des CSPG. (McGovern et al., 2009). Ce phénotype Pro (*proximal tumor*) est par exemple rencontré chez le mutant Notch gain de fonction *glp-1(ar202)* qui promeut l'état indifférencié des cellules germinales sans prévenir complètement l'entrée en méiose. Ce mutant exprime une protéine GLP-1 qui porte une substitution G529E dans le premier motif LNR (LIN-12/Notch) de son domaine extracellulaire, rendant le récepteur constitutivement actif et seulement partiellement dépendant du ligand LAG-2 (Pepper et al., 2003a). Chez les mutants *glp-1(ar202)*, l'augmentation du signal Notch retarde l'entrée en méiose jusqu'au stade L4, donc après la naissance des paires de cellules *sheath* proximales. Celles-ci peuvent alors entrer en contact avec des cellules indifférenciées qui sont compétentes pour recevoir un signal de prolifération, agissant ainsi comme des niches latentes (Killian and Hubbard, 2005) (McGovern et al., 2009) (Figure 1.16). À l'opposé, chez les vers adultes de type sauvage, la paire de cellules *sheath* proximale Sh2 joue un rôle dans la progression méiotique, l'apoptose au sein de la zone pachytène et l'engloutissement des corps apoptotiques, alors que les paires proximales Sh3/4/5 sont des cellules contractiles qui permettent l'ovulation (Gumienny et al., 1999; Hall et al., 1999; Li et al., 2012; McCarter et al., 1997; Rose et al., 1997). L'élongation de la gonade est aussi essentielle à la formation des gamètes et dépend de deux processus indépendants: la migration de la DTC (Kimble and White, 1981) et la capacité des cellules germinales à remplir l'espace de la gonade, une propriété directement liée à leur prolifération (Hubbard, 2007; Killian and Hubbard, 2005; McGovern et al., 2009; Nishiwaki, 1999). Ainsi, le phénotype Pro peut être rencontré chez des mutants qui ont des défauts de prolifération des CSG ou de

migration de la DTC aux stades larvaires. L'aspect migratoire de la DTC sera décrit en plus amples détails dans la section 1.4.6.1

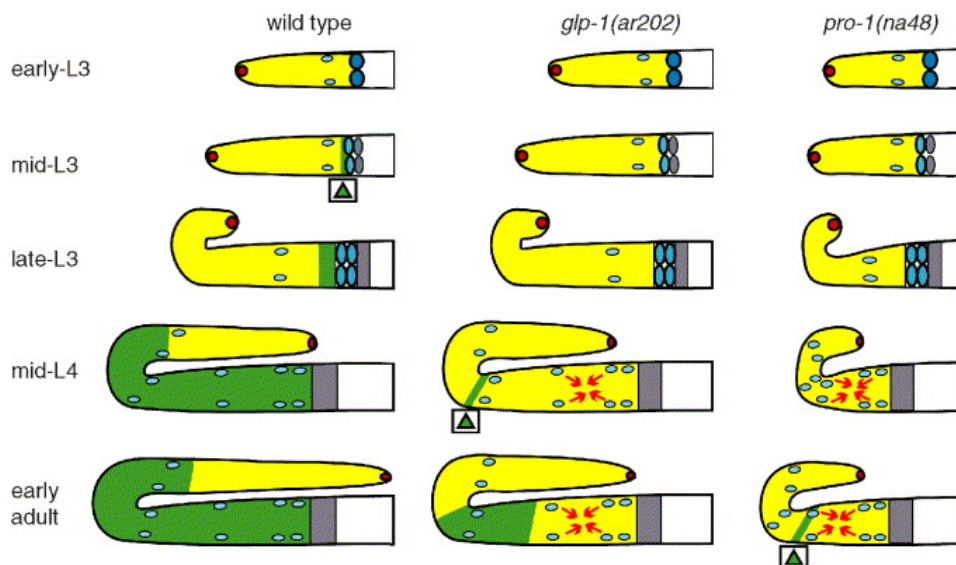


Figure 1.15 Modèle de formation des tumeurs proximales.

Les tumeurs proximales sont induites suite au signal de prolifération (représenté par des flèches rouges) provenant des cellules *sheath* proximales (représentées par des cercles bleus) qui établissent un contact anormal avec les cellules mitotiques (en jaune) lors d'un délai dans l'entrée initiale en méiose. Chez les mutants *glp-1(ar202)*, ce délai provient d'une augmentation de la prolifération alors que chez les mutants *pro-1(na48)*, il est causé par une diminution de la prolifération. Figure recopiée avec permission, provenant de (Killian and Hubbard, 2005).

À l'entrée au stade adulte, la niche arrête sa migration et change de morphologie en étendant de longues protrusions ou extensions membranaires qui couvriront la zone mitotique (Fitzgerald and Greenwald, 1995; Hall et al., 1999; Henderson et al., 1994). La première paire de cellules *sheath* perd contact avec les CSPG et n'assiste plus la niche dans la régulation de leur prolifération. L'homéostasie s'installe au sein de la zone mitotique, maintenant un nombre à peu près constant de ~200-250 CSPG par bras de gonade, chez l'hermaphrodite comme chez le mâle (Crittenden et al., 2006; Killian and Hubbard, 2005; Lamont et al., 2004; Maciejowski et al., 2006; Morgan et al., 2010) (Figure 1.14 et 1.17)

En absence de marqueur pour suivre l'origine de la lignée cellulaire de chaque CSG, la localisation et même l'existence de réelles cellules souches germinales (par opposition à des

progéniteurs) restent controversées. Il existe cependant des différences dans le comportement des CSPG le long de l'axe distal-proximal, laissant envisager qu'elles ne sont pas toutes équivalentes dans leur potentiel de cellules souches. Premièrement, l'index mitotique est moins élevé chez les CSG les plus distales, avec une valeur de 2.9% dans les rangées de noyaux 1-2 (celles collées au corps cellulaire de la niche) contre 4.3% dans les rangées 3-10 (dû à une phase M plus longue) et 0.4% dans les rangées 17-23 (dû à l'entrée en phase S pré-méiotique) (Crittenden et al., 2006; Maciejowski et al., 2006). Plus récemment, l'hypothèse selon laquelle les cellules souches résideraient au sein des rangées les plus distales a été soutenue par quelques observations. D'une part, les cellules germinales de la zone mitotique sont continuellement poussées vers la région méiotique proximale, tel que visualisé lors d'expériences d'incorporation de BrdU. L'absence de mouvement inverse important, soit celui des CSPG proximales vers le pôle distal, laisse envisager que seules les rangées les plus distales contribueront à la descendance des CSPG de la région mitotique au fil du temps (Crittenden et al., 2006). D'autre part, des évidences suggèrent que les CSPG des rangées plus proximales sont déjà commises au programme de différenciation. En effet, suite à un arrêt des divisions mitotiques chez des mutants thermosensibles pour la sous-unité APC-4 du complexe de promotion de l'anaphase (APC), toutes les CSPG finissent par se différencier à l'exception de celles des rangées distales 1 à 8 qui gardent leur identité de cellule souche. Le maintien de ces « vraies cellules souches » dépend du signal Notch activé par la DTC (Cinquin et al., 2010). Il est aussi intéressant de noter que ces cellules souches maintiennent des contacts directs avec la niche chez l'adulte, où elles sont soit directement juxtaposées au corps cellulaire de la DTC ou se situent dans une zone riche en petites extensions membranaires internes à la gonade et émanant de la niche pour s'intercaler entre les CSGs des rangées les plus distales (Byrd et al., 2014). Un contact direct avec la niche apparaît donc nécessaire pour définir l'identité de cellule souche.

Il est surprenant de constater que malgré la simplicité du modèle, le mécanisme exact maintenant l'homéostasie au sein de la zone mitotique et déterminant sa longueur chez l'adulte reste inconnu. La lignée germinale de *C. elegans* ne montre pas d'aspect visuellement évident de divisions asymétriques au sein de sa lignée germinale, du moins relativement à l'axe distal-proximal de la gonade, et il demeure incertain si le nombre de cellules souches est maintenu

uniquement par la limitation de l'espace de la niche. L'explication sous-jacente à l'absence d'orientation visible dans les divisions des CSGs pourrait résider dans la complexité morphologique qu'adopte la niche durant la phase de maintien des CSPG. En effet, la niche étend au stade adulte de longues extensions membranaires qui établissent des contacts directs avec les cellules souches via des jonctions gap (Starich et al., 2014). Puisqu'elles contiennent la protéine LAG-2, elles ont d'abord été conçues comme des structures permettant d'apporter le signal Notch aux CSPG (Crittenden et al., 2006; Fitzgerald and Greenwald, 1995; Henderson et al., 1994). Bien que plausible, cette hypothèse a cependant uniquement été testée par l'infirmité d'une corrélation claire entre la longueur de la zone mitotique et celle des extensions, du moins chez les vers âgés où la longueur de la zone de prolifération diminue, mais pas celle des extensions (Crittenden et al., 2006; Fitzgerald and Greenwald, 1995; Hall et al., 1999). Aucune étude n'a donc réellement permis de caractériser le rôle de l'ensemble de ces extensions dans le comportement des cellules souches.

1.4.3. Deuxième objectif de recherche

J'ai entamé mon deuxième projet de doctorat en émettant l'hypothèse que les changements morphologiques de la niche pourraient réguler le comportement des cellules souches chez l'adulte. Ainsi l'apparente absence d'orientation préférentielle dans les divisions des CSG selon l'axe de la gonade pourrait avoir des causes différentes chez les larves et chez les adultes. Durant les phases d'expansion des CSG (stades larvaires) elle pourrait s'expliquer par la présence d'un mélange de divisions symétrique et asymétrique ou par la présence de signaux dans l'axe transversal à celui distal-proximal, provenant des cellules *sheath*. Chez l'adulte, il n'est pas inconcevable que le maintien des CSG fasse intervenir une division asymétrique, non pas selon l'axe distal-proximal, mais plutôt en rapport avec le signal émanant d'une extension. Cette possibilité n'a jamais été testée, probablement en raison de la structure trop élaborée de la niche. J'ai donc d'abord entrepris de comprendre le mécanisme de formation de ces extensions pour pouvoir en réduire la complexité et ainsi obtenir des conditions favorables à l'étude de leur rôle dans la division des cellules souches. Mes résultats préliminaires ont permis de trouver de telles conditions en plus d'établir la lignée germinale de

C. elegans comme un modèle pour l'étude d'une communication bidirectionnelle entre la niche et les cellules souches au cours du développement. Je continuerai donc ce chapitre d'introduction par la description des caractéristiques de la niche.

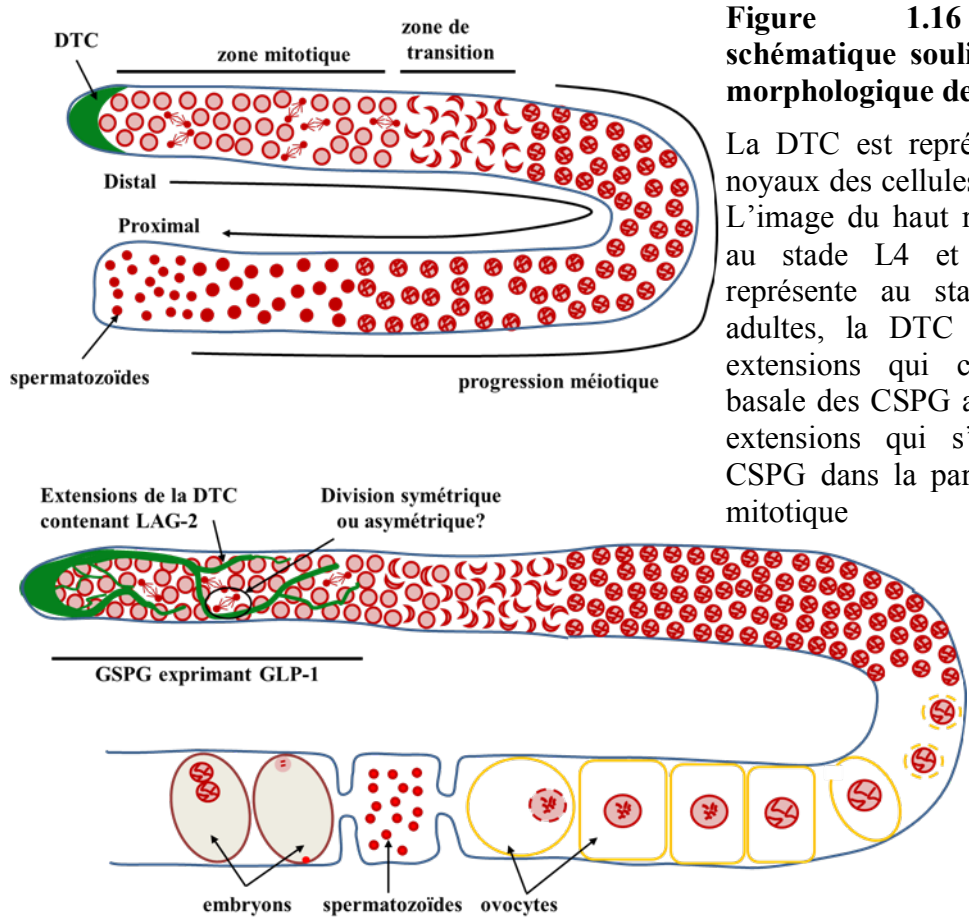


Figure 1.16 Représentation schématique soulignant la maturation morphologique de la niche.

La DTC est représentée en vert et les noyaux des cellules germinales en rouge. L'image du haut représente une gonade au stade L4 et l'image du bas la représente au stade adulte. Chez les adultes, la DTC possède des longues extensions qui contactent la surface basale des CSPG ainsi que de plus fines extensions qui s'intercalent entre les CSPG dans la partie distale de la zone mitotique

1.4.4. La voie Notch comme principal régulateur du maintien des CSPG par la niche chez *C. elegans*

1.4.4.1. Rôles généraux de la voie Notch chez différents organismes

Il y a un siècle, Morgan et ses collègues observèrent qu'une mutation dominante liée au chromosome X causait des encoches aux ailes de la Drosophile. Suivant sa propre tradition de nommer les gènes de Drosophile d'après le phénotype de leurs allèles mutants, il appela ce gène Notch (Morgan, 1917). La séquence du récepteur Notch fut ensuite identifiée chez la Drosophile et chez *C. elegans* (Greenwald, 1985; Wharton et al., 1985). Plusieurs études ont depuis démontré que la voie canonique Notch régule de multiples processus développementaux et physiologiques chez différentes espèces. Les premières évidences d'une régulation du destin des cellules souches par Notch proviennent d'études chez la Drosophile. Dans le système nerveux central et périphérique de celle-ci, la voie Notch régule le nombre de neuroblastes ou de cellules SOP (Sensory Organ Progenitor cells) produites à partir du neuroépithélium par inhibition latérale (Artavanis-Tsakonas and Simpson, 1991; Furukawa et al., 1992; Schweisguth and Posakony, 1992). Au cours de ce processus, les cellules donneuses du signal Notch, qui expriment un ligand DSL, adoptent un destin neuronal et inhibent ce destin chez cellules voisines exprimant le récepteur Notch. Cette spécification est le résultat d'une répression des gènes pro-neuronaux par la voie Notch. Suite à la division de la cellule SOP, Notch régule la décision de la spécification cellulaire neuronale ou gliale en assurant que la cellule fille pIIb, donneuse du signal Notch, inhibe le destin neuronal chez pIIa. La perte de fonction de Notch présente donc un phénotype neurogénique chez la Drosophile (Knust and Campos-Ortega, 1989; Poulson, 1937). Chez les vertébrés, Notch joue plusieurs rôles au sein du système nerveux et du système hématopoïétique. Ainsi, le récepteur Notch1 fut d'abord identifié dans les cellules hématopoïétiques à cause de sa localisation au point de rupture d'une translocation retrouvée chez certains enfants atteints de la leucémie lymphoblastique aiguë (Ellisen et al., 1991). Le signal Notch a par la suite été démontré comme régulant la spécification des lymphocytes T par rapport aux lymphocytes B (Han et al., 2002; Radtke et al., 1999). Au sein du système nerveux central des vertébrés, Notch agit en plusieurs temps; il

inhibe d'abord la différenciation neuronale des progéniteurs durant le développement puis promeut le destin cellulaire glial (Bao and Cepko, 1997; Gaiano et al., 2000; Henrique et al., 1997; Ishibashi et al., 1994; Ohtsuka et al., 2001; Sakamoto et al., 2003). Dans les cerveaux adultes, Notch régule la quiescence des cellules souches neuronales et sa perte résulte en leur prolifération et leur différenciation (Chapouton et al., 2010; Stump et al., 2002). De façon générale, la voie de signalisation Notch est importante pour la différenciation, le maintien et la prolifération des cellules souches dans presque tous les systèmes examinés, incluant la lignée germinale, les intestins, le système nerveux, le système hématopoïétique, les muscles ainsi que plusieurs tissus épithéliaux. Seule son implication chez *C. elegans* sera dorénavant abordée.

Les récepteurs Notch sont conservés au sein des différentes espèces alors que leurs ligands DSL sont plus variables en structures (D'Souza et al., 2010) (Figure 1.18). *C. elegans* possède un total de 10 gènes encodant des membres de la famille DSL et deux récepteurs Notch, LIN-12 et GLP-1 (Chen and Greenwald, 2004). Notch régule, entre autres, l'induction du mésoderme chez l'embryon ainsi que le destin des précurseurs de la vulve et l'identité des cellules souches de la lignée germinale chez l'adulte. Selon le contexte, l'induction du destin cellulaire se fait par l'interaction entre GLP-1 ou LIN-12 et au moins 1 des 4 ligands DSL pour lesquels un rôle d'activateur de la voie Notch a été décrit, soit les ligands LAG-2, APX-1, ARG-1 et DSL-1. Par exemple, chez l'embryon, GLP-1 est exprimé par deux blastomères équivalents, ABa et ABp alors que APX-1 est exprimé par le blastomère P₂ (Mango et al., 1994; Mello et al., 1994; Mickey et al., 1996). L'orientation spécifique des cellules ABp et ABa au stade 4 cellules est assurée par la division asymétrique précédente et permet que seule ABp contacte P₂, générant un signal Notch chez ABp seulement. Cette interaction prévient la production de mésoderme par ABp (Hutter and Schnabel, 1994; Mango et al., 1994; Mello et al., 1994; Moskowitz et al., 1994). Chez les précurseurs de la vulve, LIN-12 est impliqué dans l'inhibition latérale au cours de la décision entre la spécification AC (*anchor cell*) ou VU (*ventral uterine cell*). Les deux précurseurs expriment initialement LIN-12 et LAG-2, mais une faible différence dans l'activité de LIN-12 est amplifiée par une boucle d'auto-régulation positive du signal Notch dans le précurseur VU. Un signal Notch faible dans l'autre précurseur promeut le destin AC (Seydoux and Greenwald, 1989; Wilkinson et al., 1994). La cellule AC induit ensuite préférentiellement, via la voie EGF, le destin 1° chez une des trois cellules

centrales précurseurs de la vulve (VPCs). L'augmentation de production des ligands DSL dans cette VPC 1° active LIN-12 chez les deux VPCs voisines ce qui spécifie chez elles le destin 2° et inhibe le destin 1°. Dans la lignée germinale, le signal Notch maintient la population de CSPG grâce à l'activation du récepteur GLP-1 des CSPGs par les ligands LAG-2 et APX-1 exprimés dans la niche (Austin and Kimble, 1987; Crittenden et al., 1994; Henderson et al., 1994; Nadarajan et al., 2009).

1.4.4.2. Les composants de la voie Notch sont conservés chez *C. elegans*

Les récepteurs Notch sont des protéines à un passage transmembranaire ayant des domaines extracellulaire (NECD) et intracellulaire (NICD) fonctionnellement distincts, avec le NECD régulant la liaison au ligand et le NICD régulant l'expression des gènes cibles. La partie extracellulaire des récepteurs Notch possède de multiples motifs EGF (*epidermal growth factor-like motif*) en N-terminal dont le nombre varie selon les espèces et les récepteurs (14 pour LIN-12 et 11 pour GLP-1) et qui sont responsables de la liaison au ligand. Elle contient aussi 3 motifs LNR (*LIN-Notch Repeats*) chez *C. elegans* et un domaine d'hétérodimérisation. Un court domaine transmembranaire précède le domaine intracellulaire. Ce dernier contient un domaine RAM et des répétitions ankyrines importantes pour les interactions protéiques du NICD avec les facteurs de transcription des gènes cibles ainsi qu'un domaine TAD d'activation de la transcription. Enfin, l'extrémité C-terminale arbore un domaine PEST, impliqué dans la dégradation du NICD (Fleming, 1998; Greenwald and Kovall, 2013) (Figure 1.18). Chez les vertébrés, les récepteurs Notch nouvellement synthétisés sont clivés au site S1 situé dans la région d'hétérodimérisation. Ce clivage, qui a lieu dans le trans-Golgi, est effectué par des protéases de la famille Furine et permet la formation d'un hétérodimère présent à la membrane plasmique (Blaumueller et al., 1997; Logeat et al., 1998). Bien qu'une telle maturation des récepteurs Notch de *C. elegans* n'ait pas été démontrée, la visualisation de GLP-1 par western blot suggère que la forme entière de la protéine est minoritaire et que GLP-1 forme aussi un hétérodimère à la membrane des CSPG (Crittenden et al., 1994) (Figure 1.19).

Les ligands DSL sont généralement aussi des protéines à un passage transmembranaire. Bien qu'ayant une structure moins conservée, ils ont en commun un motif DSL en N-terminal et un nombre variable de motifs EGF, lesquels précèdent le domaine transmembranaire (Fleming, 1998; Henderson et al., 1994; Tax et al., 1994) (Figure 1.18). Chez *C. elegans*, le motif DSL, mais pas les deux motifs EGF, serait nécessaire à la fonction de LAG-2 dans la lignée germinale (Henderson et al., 1997). Il est intéressant de noter que même si LIN-12 et GLP-1, ainsi que leurs ligands naturels LAG-2, APX-1, ARG-1, et DSL-1, sont impliqués dans la détermination cellulaire au sein de tissus différents, ils sont fonctionnellement interchangeables (Fitzgerald and Greenwald, 1995; Fitzgerald et al., 1993; Seydoux et al., 1990). LIN-12 et GLP-1 sont aussi partiellement redondants puisque la perte des deux récepteurs engendre un phénotype distinct et non additif par rapport à celui observé chez les simples mutants. Ce phénotype, appelé *Lag* pour *Lin-12 And Glp-1*, est caractérisé par différents défauts et une létalité au stade larvaire L1. Les gènes *lag-2* et *lag-1* furent identifiés sur la base du phénotype *Lag* dans un crible génétique (Lambie and Kimble, 1991).

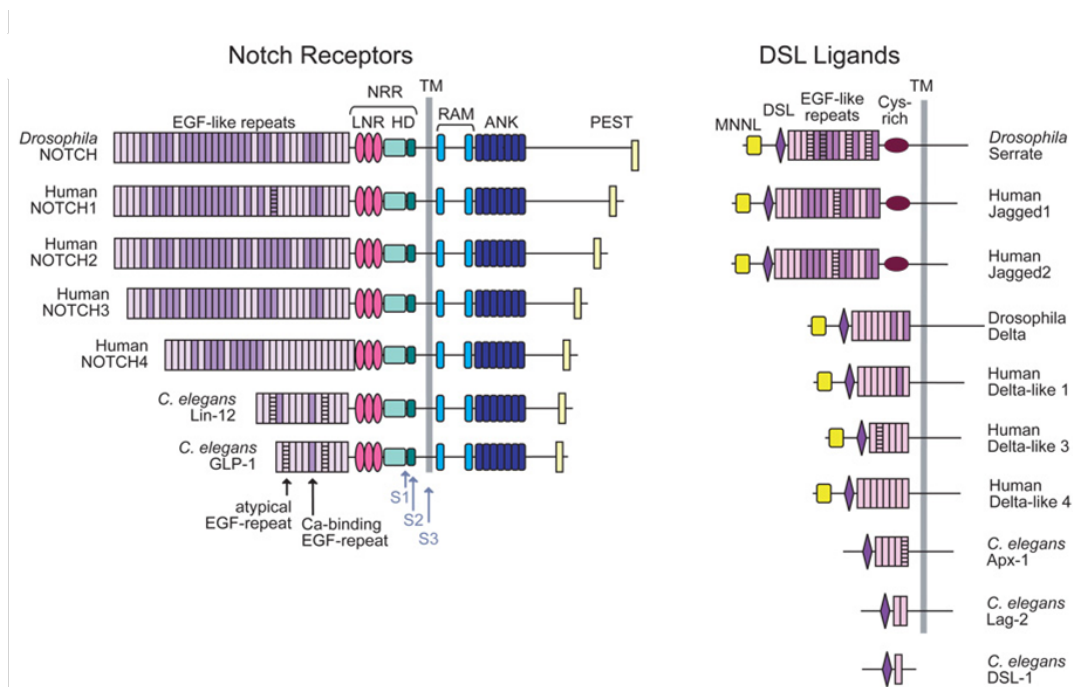


Figure 1.17 Nature moléculaire des récepteurs Notch et de leur ligand de la famille DSL.

Organisation des domaines protéiques des récepteurs Notch et de certains de leurs ligands de la famille DSL (Delta/Serrate/LAG-2) chez la Drosophile, l'Homme et *C. elegans*. La position des trois sites de clivages du récepteur Notch (S1, S2, S3) est indiquée par les flèches. Les abréviations sont données dans la section abréviations. Figure recopiée avec permission, provenant de (Gordon et al., 2008).

La voie de signalisation canonique Notch est donc initiée par la liaison du ligand Delta, exprimé à la surface de la cellule donneuse, au récepteur Notch qui se trouve à la surface de la cellule réceptrice (Fehon et al., 1990). L'engagement du ligand expose le site de clivage S2 du récepteur Notch situé dans le domaine extracellulaire juxtaposé à la membrane. Ce clivage au site S2 est catalysé par des métalloprotéases de la famille ADAM, incluant SUP-17 (homologue de Kubanian/ADAM-10) et ADM-4 (homologue de TACE) chez *C. elegans* (Jarriault and Greenwald, 2005; Tax et al., 1997; Wen et al., 1997). En absence de liaison du ligand, ce site est rendu inaccessible par la région de régulation négative du récepteur Notch (NRR) qui inclue les motifs LNR (Gordon et al., 2009; Sanchez-Irizarry et al., 2004). Plusieurs mutations affectant le NRR engendrent donc des formes constitutivement actives du ligand GLP-1, incluant celle de l'allèle *glp-1(ar202)* (Berry et al., 1997; Greenwald and Seydoux, 1990; Pepper et al., 2003a; Weng et al., 2004). Suite au clivage du site S2, l'hétérodimère Notch devient sensible à un deuxième clivage par le complexe enzymatique γ -sécrétase au site trans-membranaire S3, ce qui libère le fragment intracellulaire de la membrane. Les membres du complexe γ -sécrétase incluent les Presenilines SEL-12 et HOP-1 ainsi que APH-1, PEN-2 et APH-2 (homologue de Nicastrin) chez *C. elegans* (Francis et al., 2002; Goutte et al., 2002; Levitan and Greenwald, 1995; Li and Greenwald, 1997; Westlund et al., 1999). Suite au clivage, le NICD se relocalise au noyau et s'assemble avec le facteur de transcription CSL (CBF chez l'humain, Su(H) chez la Drosophile, LAG-1 chez *C. elegans*) (Christensen et al., 1996; Jarriault et al., 1995). Ceci a pour effet de transformer le complexe répresseur associé à LAG-1 en un complexe activateur de la transcription (Figure 1.19). Enfin, LAG-3 interagit avec LAG-1 ainsi qu'avec le NICD de GLP-1 et sa perte montre un phénotype *Lag*, suggérant qu'il est l'orthologue du co-activateur Mastermind au sein du complexe d'activation de la transcription en aval de la voie Notch (Petcherski and Kimble, 2000a, b; Wu et al., 2000).

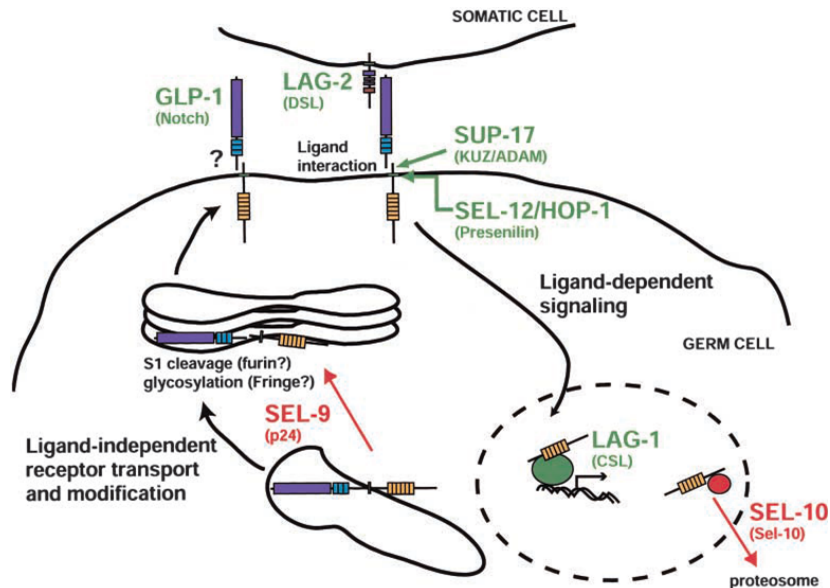


Figure 1.18 Schématisation de la voie Notch chez *C. elegans*.

Les événements majeurs de la maturation et de la signalisation sont représentés dont certains sont inférés de ce qui a été trouvé chez d'autres organismes. Pour chacun, les protéines de *C. elegans* sont mentionnées avec leurs homologues entre parenthèses. Les flèches vertes désignent les sites de clivages S2 et S3. Les facteurs régulant positivement le signal Notch dans la lignée germinale sont en vert alors que ceux le régulant négativement sont en rouge. Figure recopiée avec permission, provenant de (Pepper et al., 2003a).

1.4.4.3. Les aspects spécifiques de la voie Notch chez *C. elegans*

L'initiation de la voie Notch par l'interaction entre deux protéines membranaires est donc présumée dépendante d'un contact direct de cellule à cellule, ce qui est paradoxal avec le rôle de Notch dans le maintien du bassin des CSPG à distance de la niche chez *C. elegans*. Tel que mentionné précédemment, la niche peut toutefois contacter directement les CSPG via des extensions membranaires chez l'adulte (Fitzgerald and Greenwald, 1995). Chez la Drosophile, Delta peut activer Notch à distance en se mobilisant le long d'extensions cellulaires de type filopodia (De Jossineau et al., 2003; Renaud and Simpson, 2001). La propagation du signal Notch aux stades larvaires et adultes sera discutée dans le chapitre 4.

Il est aussi intéressant de noter que les ligands DSL chez *C. elegans* présentent des différences avec ceux des autres organismes. Ces différences pourraient avoir des répercussions sur le mécanisme par lequel l'engagement des ligands DSL active le récepteur Notch. Chez la Drosophile et les vertébrés, plusieurs évidences suggèrent que l'ubiquitination

du domaine intracellulaire des ligands DSL, suivie de leur endocytose dans la cellule donneuse du signal Notch, sont requises en amont du clivage S3. Premièrement, la dynamine, importante pour l'invagination des vésicules d'endocytose, est essentielle à l'activation de Notch (Parks et al., 2000; Seugnet et al., 1997). En accord avec cette observation, des formes mutées de Delta ne permettant pas son endocytose ou des formes solubles de Delta réduisent le signal Notch (Parks et al., 2000; Shimizu et al., 2002). Pour activer la voie Notch, Delta doit donc d'abord être ubiquitilé par les E3 ligases Neuralized ou Mindbomb, (Deblandre et al., 2001; Itoh et al., 2003; Lai et al., 2001; Pavlopoulos et al., 2001; Yeh et al., 2001) puis probablement être internalisé/trafiqué par la protéine Epsin, un adaptateur d'endocytose qui dirige le trafic de cargo ubiquitilés (Wang and Struhl, 2004, 2005). Deux principaux modèles, non mutuellement exclusifs, tentent d'expliquer le rôle de l'endocytose de Delta dans l'activation de Notch. D'une part, cette endocytose pourrait favoriser un recyclage de Delta et le retour d'une forme active à la membrane. Cependant, ce modèle pourrait être dépendant du contexte cellulaire puisqu'il est par exemple validé chez les cellules SOP (Emery et al., 2005; Jafar-Nejad et al., 2005), mais pas dans la lignée germinale de la Drosophile (Windler and Bilder, 2010). Le deuxième modèle propose que l'endocytose du ligand engagé au récepteur Notch induit un stress mécanique sur celui-ci, menant à un changement dans sa conformation et à l'exposition du site de clivage S2 (Meloty-Kapella et al., 2012; Shergill et al., 2012).

Chez *C. elegans*, l'importance même de l'endocytose de Delta dans l'activation de Notch reste à être vérifiée et est confrontée à plusieurs observations. Premièrement, *C. elegans* possède naturellement un ligand DSL-1 qui est une protéine sécrétée. Celle-ci est fonctionnellement redondante avec LAG-2 et APX-1 dans la spécification des précurseurs de la vulve, qui dépend de LIN-12 (Chen and Greenwald, 2004; Fitzgerald and Greenwald, 1995). Deuxièmement, l'expression transgénique des formes sécrétées des ligands Delta (LAG-2 et APX-1) permet d'activer LIN-12 et GLP-1 au sein de différents tissus, incluant la lignée germinale, alors que ces formes agissent pourtant comme des dominants négatifs dans d'autres organismes (Artavanis-Tsakonas et al., 1991; Fitzgerald and Greenwald, 1995). Cependant, une étude de Henderson et ses collègues s'intéressant aux régions de LAG-2 nécessaires à son activité, notamment au sein de la lignée germinale, contredit ces résultats. En effet, cette étude montre que la protéine minimale pouvant supprimer les défauts causés par la

perte de *lag-2* contient l'extrémité N-terminale de LAG-2 avec le motif DSL et la région transmembranaire (Henderson et al., 1997), ce qui suggère que LAG-2 doit être lié à la membrane pour exercer ses fonctions. Par contre, le domaine intracellulaire n'est pas requis. Un rôle pour l'endocytose de Delta dans la voie Notch a toutefois été envisagé par une étude montrant que l'Epsin EPN-1 peut influencer l'activité du ligand de façon autonome à la cellule donneuse du signal Notch dans la lignée germinale chez *C. elegans* (Tian et al., 2004).

1.4.4.4. Les cibles de Notch dans la régulation des CSGs

Malgré les effets pléiotropiques qu'engendre la voie Notch au sein de divers tissus chez tous les organismes où elle a été étudiée, un nombre limité de gènes cibles de Notch ont été identifiés. Ceux-ci incluent par exemple les gènes encodant pour les facteurs de transcription de la famille Hes/Hey (Kageyama and Ohtsuka, 1999; Kawamata et al., 2002), ainsi que des régulateurs mitotiques tel CDC25 et d'autres gènes dérégulés dans les cancers tels que Myc (Palomero et al., 2006; Weng et al., 2006), Cyclin D (Ronchini and Capobianco, 2001) et p21 (Rangarajan et al., 2001). Chez *C. elegans*, les cibles du complexe LAG-1 ont été identifiées par des cribles basés sur la présence de séquences consensus de liaison par LAG-1, puis les candidats retenus ont été validés *in vivo* pour leur rôle en aval de la voie Notch (Wilkinson et al., 1994; Yoo et al., 2004). Au sein de la lignée germinale de *C. elegans*, seulement 4 gènes ont été identifiés comme des cibles directes de GLP-1. Il s'agit de *fbf-2* (*fem-3 mRNA binding factor*, homologue de Pumillio) (Lamont et al., 2004), *lip-1* (une ERK phosphatase) (Berset et al., 2001) et plus récemment *lst-1* et *sygl-1* (spécifiques au nématode) (Kershner et al., 2014).

Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que *lst-1* et *sygl-1* sont exprimés dans la partie distale de la zone mitotique d'une façon dépendante de GLP-1. Les deux protéines encodées par ces gènes sont redondantes puisque seule la déplétion conjointe de LST-1 et SYGL-1 peut phénotyper la perte de GLP-1 au sein de la lignée germinale, aux stades larvaires et adulte. Probablement dû à leur récente découverte et à l'absence d'homologie ou de motif particulier chez LST-1 et SYGL-1, le mécanisme d'action de ces protéines dans le maintien des CSGs n'a pas été caractérisé. En accord avec leur rôle comme cibles de GLP-1,

lst-1 et *sygl-1* agissent en aval de GLP-1, mais en amont d'autres facteurs connus de la voie Notch, incluant par exemple GLD-1 et GLD-2 (Kershner et al., 2014).

Le mécanisme d'action de FBF-2 est mieux caractérisé. Le promoteur de *fbf-2* est lié par LAG-1 *in vitro*, et la protéine FBF-2 est exprimée dans la partie distale de la gonade, là où le signal Notch est élevé (Crittenden et al., 2002). FBF-2 et FBF-1, ensemble nommés FBF, possèdent 91% d'homologie de séquence et font partie de la famille PUF (pour Pumilio et FBF), suggérant que ces protéines exercent leur fonction au sein de la lignée germinale en contrôlant la stabilité ou la traduction d'ARN messagers (Friend et al., 2012; Goldstrohm et al., 2008). FBF-1 et FBF-2 lient la même séquence sur leur ARN cible, appelé élément de liaison FBF (FBE) (Bernstein et al., 2005; Zhang et al., 1997), et sont redondants pour leur rôle dans le maintien des CSGs. Alors que les doubles mutants *fbf-1; fbf-2* ont un phénotype similaire aux mutants *glp-1*, les simples mutants *fbf-1* montrent une diminution de la taille de leur zone mitotique (Crittenden et al., 2002) et les mutants *fbf-2* ont une plus grande zone mitotique (Lamont et al., 2004). Contrairement à la perte conjointe de *lst-1* et *sygl-1*, celle de *fbf-1* et *fbf-2* n'entraîne l'entrée prématurée des cellules germinales en méiose qu'à partir du stade L4 (Crittenden et al., 2002). Enfin, en accord avec leur patron d'expression complémentaire au sein de la zone mitotique ainsi qu'avec leurs fonctions distinctes et opposées dans les décisions mitose/méiose, *fbf-1* et *fbf-2* répriment leur expression réciproque (Lamont et al., 2004). Ainsi, le phénotype lié à la perte de FBF-2 pourrait être expliqué par une augmentation des niveaux de FBF-1 (Figure 1.20). D'autres évidences suggèrent qu'en plus de son rôle positif dans l'autorenouveau des cellules souches, FBF-2 promeut aussi l'entrée en méiose (Crittenden et al., 2002; Hansen and Schedl, 2006; Suh et al., 2009). La régulation des cellules souches par les protéines PUF est conservée chez la Drosophile (Forbes and Lehmann, 1998; Lin and Spradling, 1997) et leur ARNm sont présents dans les cellules souches des vertébrés (incluant les cellules embryonnaires, les cellules souches hématopoïétiques et les neuroblastes) même si leur rôle n'y a pas été caractérisé (Sandie et al., 2009).

Enfin, bien que LIP-1 soit critique pour maintenir la taille normale de la zone mitotique en inhibant la voie de signalisation MAP Kinase, cette protéine n'est pas essentielle à l'autorenouveau des CSGs (Lee et al., 2006c). En effet, les mutants *lip-1* nuls ont une

prolifération normale de leurs cellules germinales et n'augmentent pas la pénétrance du phénotype des mutants *fbf-2* (Kershner et al., 2014; Lee et al., 2006c). LIP-1 est absente de la région distale de la zone mitotique, suggérant que cette protéine régule l'étendue de la prolifération dans la région proximale de la zone mitotique.

Il est intéressant de noter que jusqu'à présent, toutes les cibles directes de GLP-1 sont aussi régulées au niveau de leur ARNm par les protéines FBF (Kershner et al., 2014; Lamont et al., 2004; Lee et al., 2006c). Par exemple, *lip-1* est négativement régulé par FBF dans la partie la plus distale de la gonade (Lee et al., 2006c). Selon une étude publiée par Kershner et ses collègues, FBF pourrait avoir plus de 1000 mRNA cibles dans la lignée germinale de *C. elegans* (Kershner and Kimble, 2010). Leurs cibles incluent, entre autres, l'inhibiteur mitotique *cki-2* (Kalchhauser et al., 2011), plusieurs composants structuraux du complexe synaptonémal important pour la ségrégation des paires de chromosomes lors de la méiose (Merritt and Seydoux, 2010) ainsi que les régulateurs des deux voies principales inhibant d'une part l'autorenouveau des CSGs et favorisant d'autre part l'entrée en méiose. Ces deux voies sont appelées voies de signalisation GLD-1 et GLD-2 (*defective in germline development*), soit par le nom du premier gène identifié dans chaque voie (Crittenden et al., 2002; Francis et al., 1995a; Francis et al., 1995b; Hansen et al., 2004b; Kadyk and Kimble, 1998) (Figure 1.20).

1.4.4.5. Les principales voies de signalisation en aval de Notch dans la décision mitose/méiose

Les voies de signalisation GLD-1 et GLD-2 sont redondantes pour permettre l'entrée en méiose et leur perte conjointe entraîne la formation de tumeurs germinales appelées tumeurs synthétiques (Kadyk and Kimble, 1998). GLD-1 agit avec NOS-3 alors que GLD-2 agit avec GLD-3 (Figure 1.20). Tout comme pour FBF, les deux protéines GLD-1 et NOS-3 exercent leurs fonctions en réprimant des ARNm cibles, démontrant l'importance de la régulation de la traduction au sein de la lignée germinale. En effet, beaucoup d'ARNm sont produits par les cellules germinales durant la prophase méiotique (dans la région pachytène) permettant d'assurer les réserves protéiques nécessaires à la maturation des ovocytes et à l'embryogenèse.

Ces ARNm doivent être réprimés lors des stades précoces de la méiose pour prévenir leur traduction prématurée au sein de la lignée germinale. L'analyse du patron d'expression de GLD-1 et celle du phénotype lié à sa perte sur la progression méiotique indique que GLD-1 joue un rôle de répresseur de la traduction. En effet GLD-1 fait partie de la famille de protéines StAR qui lient l'ARN et son homologue est l'inhibiteur traductionnel Quacking chez les mammifères (Jones and Schedl, 1995; Lee and Schedl, 2010). GLD-1 lie le 3'UTR des ARNm pour inhiber leur traduction (Jan et al., 1999; Lee and Schedl, 2001) et plusieurs cibles lui ont été identifiées *in vivo*, incluant les régulateurs mitotiques *cye-1* et *glp-1*, le régulateur de la décision spermatozoïdes/ovocyte *tra-2*, ainsi que des régulateurs de la maturation des ovocytes dans la gonade proximale; *oma-1*, *oma-2* (Lee and Schedl, 2001; Marin and Evans, 2003). Des données non publiées d'immuno-précipitation suivie de microarray suggèrent que GLD-1 pourrait lier plus de 100 ARNm *in vivo* (Lee and Schedl, 2010). L'ARNm de GLD-1 est présent au sein de toute la lignée germinale et sa traduction est réprimée par FBF dans la partie distale (Crittenden et al., 2002) alors qu'elle est favorisée par GLD-2 et GLD-4 dans la région proximale (Schmid et al., 2009; Suh et al., 2006). Son expression protéique est donc faible dans la zone mitotique et atteint un maximum dans la zone de transition où les cellules germinales entrent en méiose. Elle rediminue ensuite lorsque les cellules germinales progressent au stade diplotène de la prophase méiotique. GLD-1 agit avec NOS-3 pour réprimer le destin CSG et NOS-3 promeut l'accumulation de GLD-1 pour assurer la progression méiotique (Hansen et al., 2004b) (Figure 1.20).

Les deux protéines GLD-2 et GDL-3 régulent quant à elles positivement leurs ARNm cibles. GLD-2 encode une poly(A) polymérase alors que GLD-3 appartient à la famille Bicaudal-C et forme un complexe avec GLD-2 pour permettre son activation et sa localisation cytoplasmique (Eckmann et al., 2004; Eckmann et al., 2002; Wang et al., 2002). GLD-2 augmente la longueur de la queue poly-A de ses ARNm cibles, ce qui favorise leur traduction. GLD-2 agit de façon redondante avec une autre poly(A) polymérase identifiée plus récemment, GLD-4, pour favoriser la traduction de sa seule cible connue; l'ARNm de *gld-1* (Schmid et al., 2009; Suh et al., 2006). FBF régule cette voie en liant le 3'UTR de *gld-3*, inhibant ainsi l'accumulation de la protéine dans la zone mitotique (Eckmann et al., 2004) (Figure 1.20).

Ainsi, le modèle principal pour le maintien des CSGs place GLP-1 en amont puis ses cibles directes *lst-1*, *sygl-1*, *fbf-1* et *fbf-2* comme inhibiteurs des deux voies de signalisation GLD-1 et GLD-2 qui permettent la différenciation des cellules germinales (Kershner et al., 2014; Lamont et al., 2004). Ces deux voies sont redondantes et font intervenir la répression d'ARN messagers pro-mitotiques ainsi que la traduction d'ARNm pro-méiotiques (revue dans (Hansen and Schedl, 2006)). Puisque les niveaux de FBF diminuent lorsque les cellules germinales quittent la zone de signal élevé en activité Notch, la répression de *gld-1* et *gld-3* est alors abrogée, ce qui permet l'entrée en méiose dans la zone de transition (Figure 1.20).

Il est cependant intéressant de noter que les tumeurs synthétiques des doubles mutants nuls *gld-2*; *gld-1* ou *gld-2*; *nos-3* sont différentes de celles formées dans les mutants *glp-1* gain de fonction *glp-1(oz112gf)* puisqu'elles montrent souvent des évidences d'entrée transitoire en méiose (Hansen et al., 2004b). Ce phénotype pourrait laisser supposer que certaines cellules méiotiques entament une réversion vers un destin mitotique après un arrêt anormal en méiose, puisque GLD-1 et GLD-2 ont des rôles essentiels dans la progression méiotique (Francis et al., 1995a; Kadyk and Kimble, 1998). Hansen et ses collègues proposent plutôt que ces cellules méiotiques sont le fruit d'une inhibition incomplète de l'entrée en méiose. Ces données suggèrent donc l'existence d'une troisième voie, parallèle à GLD-1/2, dans la décision mitose/méiose en aval de GLP-1 (Hansen et al., 2004b). Cette voie, moins bien caractérisée, a été identifiée plus récemment et dépend du complexe cycline E/CDK-2. CYE-1 et CDK-2 sont constitutivement actifs au sein de toute la zone mitotique, ce qui permettrait l'entrée en phase S au sein des cellules germinales dépourvues de phase G1 (Fox et al., 2011). La déplétion de CYE-1 et/ou CDK-2, comme celle d'autres régulateurs du cycle cellulaire, promeut l'entrée en méiose des GSPG dans la partie proximale de la zone mitotique suite à un arrêt dans le cycle cellulaire (Cinquin et al., 2010; Fox et al., 2011; Jeong et al., 2011). Cependant, au-delà de son rôle dans le cycle cellulaire, CYE-1/CDK-2 aurait aussi un rôle spécifique dans le destin cellulaire, en favorisant l'autorenouveaulement des CSPG (Figure 1.20). D'une part ce complexe régule négativement l'accumulation de GLD-1, probablement par phosphorylation. D'autre part il agit parallèlement à GLD-1/GLD-2 puisque la perte d'activité de CYE-1/CDK-2 chez des doubles mutants *gld-2*; *gld-1* augmente significativement le nombre de cellules capables d'initier l'entrée en méiose. Enfin, la déplétion de *cye-1* ou *cdk-2*, mais pas celle d'autres

régulateurs du cycle, entraîne une extension de la localisation de GLD-1 dans la région distale et promeut l'entrée en méiose de toutes les CSGs chez des animaux possédant un allèle hypomorphe de *glp-1* (Fox et al., 2011; Jeong et al., 2011). Le complexe CYE-1/CDK-2 constitue donc un autre exemple qui démontre que des régulateurs du cycle cellulaire peuvent réguler des événements liés au maintien de l'identité cellulaire, permettant de coordonner les deux processus.

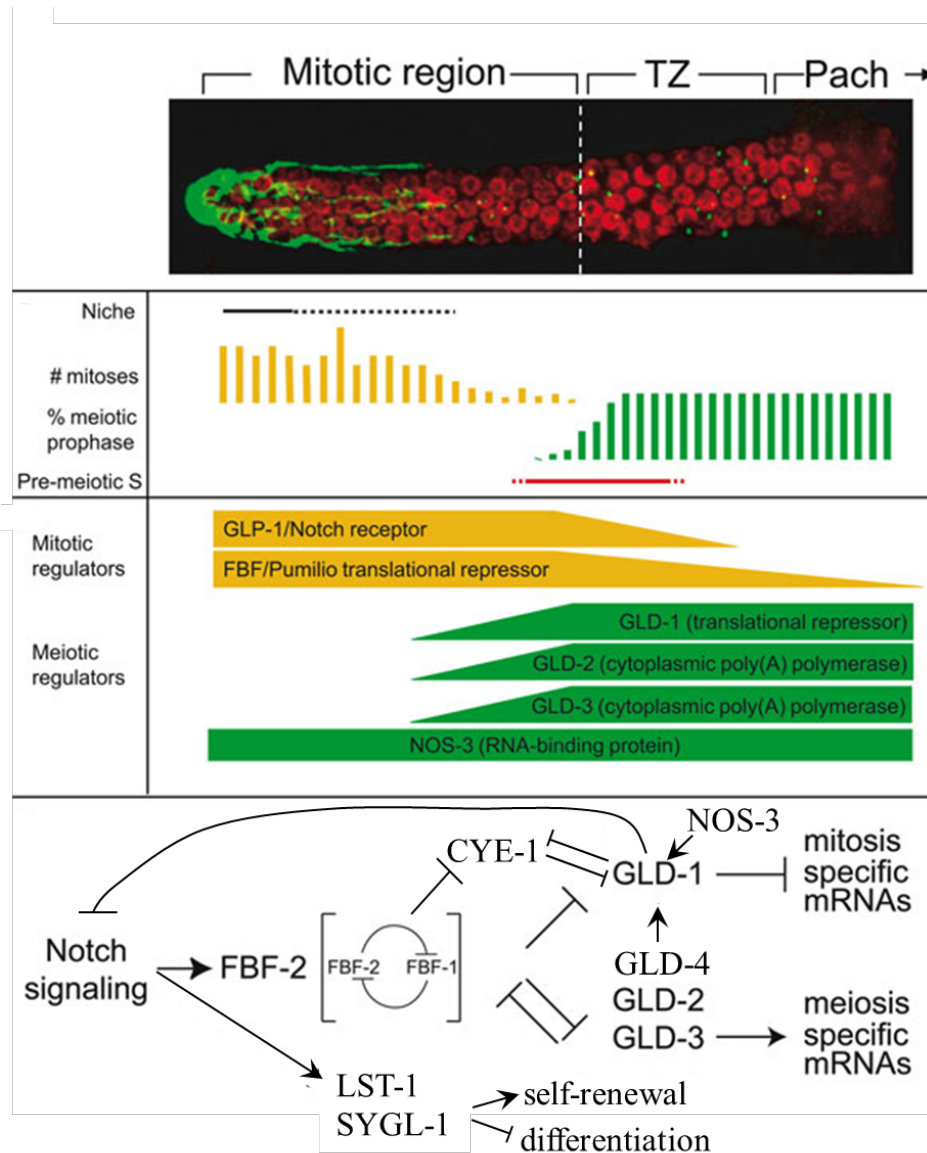


Figure 1.19 Régulation de la décision mitose/méiose en aval de la voie Notch.

L'image du haut montre une gonade disséquée avec la DTC en vert et les noyaux des cellules germinales en rouge. Les zones mitotiques, de transition (TZ) ou pachytène sont indiquées. Cette image sert de référence spatiale pour montrer le comportement des cellules germinales (premier encadré) puis la localisation des régulateurs de la décision mitose/méiose (deuxième encadré) dans l'axe distal-proximal de la gonade. Le schéma final représente les relations de répression ou d'activation entre les différents composants en aval de la voie Notch qui régulent la décision mitose/méiose. Figure adaptée avec permission, provenant de (Kimble and Crittenden, 2005)© wormbook.org. Lien vers la licence : <https://creativecommons.org/licenses/by/2.5/>

1.4.5. L'interaction Notch/Delta comme mécanisme d'adhésion cellulaire

L'interaction entre Notch et ses ligand DSL a d'abord été démontrée dans des cellules S2 chez lesquelles la surexpression de Delta ou Serrate mène à la formation d'énormes agrégats avec des cellules S2 surexprimant Notch (Fehon et al., 1990; Rebay et al., 1991). Ainsi, bien que cette interaction fût par la suite majoritairement étudiée dans le contexte de la voie de signalisation Notch, son rôle dans l'adhésion cellulaire a aussi été envisagé dans divers types cellulaires. Par exemple au sein de la chambre d'œuf de la Drosophile, une diminution des niveaux de Notch ou de ses ligands DSL entraîne une morphologie anormale de l'épithélium folliculaire, laquelle a été spéculée comme étant le résultat d'une perte d'adhésion plutôt que celle d'une transformation cellulaire (Goode et al., 1996). Ce rôle semble conservé chez les mammifères puisque des mastocytes de souris exprimant naturellement les récepteurs Notch1 et Notch2 adhèrent plus fortement à des cellules stromales exprimant un des ligand Delta-Like ou Jagged comparativement à des cellules stromales contrôles, et ce d'une façon indépendante du signal Notch (Akihiko et al., 2010; Murata et al., 2014). Il peut sembler paradoxal que l'interaction Notch/Delta puisse efficacement assumer un rôle dans l'adhésion et dans la signalisation cellulaire puisque le premier rôle requiert un ancrage membranaire du récepteur alors que le deuxième dépend de son clivage. Cependant, une étude utilisant la microscopie à force atomique suggère une corrélation positive entre la force d'adhésion récepteur/ligand et vitesse d'amplification du signal Notch chez des cellules S2 (Ahimou et al., 2004). Les forces nécessaires pour détacher Notch de Delta-Like-1 dans ce système sont considérables, de l'ordre 14 nN, mais diminuent suite à l'augmentation du clivage S3 intracellulaire du récepteur. Il est intéressant de noter que ces forces d'adhésion sont affectées par des délétions ou même des mutations ponctuelles dans les domaines extracellulaire et intracellulaire du récepteur Notch (Ahimou et al., 2004).

1.4.6. Les caractéristiques morphologiques de la niche au cours du développement

1.4.6.1. La DTC est une cellule migratoire durant les stades larvaires

Chez l'hermaphrodite, la DTC est une cellule migratoire qui suit un trajet unique, permettant l'élongation de chaque bras de gonade durant les stades larvaires. Au stade adulte, la DTC cesse sa migration et chaque bras de gonade possède une forme caractéristique en U (Hedgecock et al., 1987; Kimble and Hirsh, 1979). La trajectoire de la DTC peut être décomposée en une succession de trois migrations unidirectionnelles (Hedgecock et al., 1987; Nishiwaki, 1999). À partir du stade L2, les 2 DTCs, enveloppées sous la membrane basale de la gonade, commencent à se déplacer linéairement le long de la membrane basale des muscles ventraux, s'éloignant ainsi de leur position centrale dans des directions opposées. C'est la phase 1 de la migration. Au stade L3, durant la phase 2, la DTC entreprend deux virages. Le premier la fait quitter la membrane basale ventrale pour la faire migrer sur la membrane de l'hypoderme, vers la partie dorsale de l'animal. Le deuxième virage la positionne pour une migration vers le centre du vers, du côté dorsal. Le cheminement linéaire de la DTC qui s'en suit, le long de la membrane basale des muscles dorsaux, s'effectue pendant le stade L4 et constitue la phase 3 de la migration. La migration cesse au stade adulte, avec les 2 DTCs ayant une position centrale dans l'animal (Kimble and Hirsh, 1979; Kimble and White, 1981) (Figure 1.14).

Chacune des phases de migration dépend de déterminants spécifiques qui agissent soit à distance, comme les facteurs de guidances importants pour la directionnalité, soit localement, comme ceux permettant le lien entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire (MEC) et le remodelage de la MEC durant la migration. Ces régulateurs ont été identifiés sur la base du phénotype de leur déplétion. Ceux affectant la phase 2 ou 3 de la migration sont les plus nombreux et incluent, entre autres, des récepteurs à intégrines (INA-1, PAT-2, PAT-3) (Baum and Garriga, 1997; Lee et al., 2001; Meighan and Schwarzbauer, 2007), les protéines du système de guidance netrine (UNC-6, UNC-5, UNC-40) (Chan et al., 1996; Hedgecock et al., 1987; Leung-Hagesteijn et al., 1992), des facteurs de transcription (VAB-3) (Cram et al., 2006; Meighan and Schwarzbauer, 2007; Nishiwaki, 1999) ainsi que des petites GTPases

(RAC-2, MIG-2, CED-10, CDC-42) (Lucanic and Cheng, 2008; Reddien and Horvitz, 2000). Les régulateurs de l'initiation (phase 1) de la migration sont moins nombreux et incluent GON-1, une métalloprotéase sécrétée de la famille ADAMTS, MIG-6, une protéine de la MEC et orthologue de la protéine papiline ainsi que HLH-2, un facteur de transcription régulant les niveaux de GON-1 et de MIG-6 (Blelloch and Kimble, 1999; Cram et al., 2006; Kawano et al., 2009; Nishiwaki, 1999). L'expression de GON-1 par la DTC serait essentielle au remodelage de la matrice extracellulaire lors de la migration. La perte de cette métalloprotéase engendre non seulement des malformations dans la morphologie de la gonade, mais aussi dans celle des cellules somatiques qui y sont associées, incluant les cellules *sheath* et la DTC qui ne forment pas d'extensions au stade adulte (Blelloch et al., 1999).

Les protéines impliquées dans la cessation de la migration commencent à être identifiées et incluent MIG-39, une protéine à domaine BED, CACN-1, l'homologue de Cactin chez la Drosophile, CCDC-55, une protéine à motif superhélice conservée chez les eucaryotes et VAB-3, l'orthologue de Pax6, un facteur de transcription conservé chez la Drosophile et les mammifères (Kikuchi et al., 2015; Meighan and Schwarzbauer, 2007; Tannoury et al., 2010). Ce dernier a largement été étudié pour son rôle dans le développement du cerveau et de l'œil. Chez *C. elegans* comme chez les mammifères, Pax6 contient deux domaines de liaison à l'ADN, un domaine paired (PD) et un homéodomaine de type paired (HD) et est essentiel à la spécification de certains neurones (Chamberlin and Sternberg, 1995; Chisholm and Horvitz, 1995; Osumi et al., 2008; Zhang and Emmons, 1995). Il est principalement exprimés par les cellules gliales, lesquelles maintiennent l'homéostasie au sein du système nerveux central en soutenant la production des neurones et leur croissance. Ainsi, Pax6 module la balance entre prolifération et différenciation des cellules souches neuronales chez la souris et VAB-3 régule l'extension des dendrites ainsi que la guidance et l'embranchement des axones chez *C. elegans* (Osumi et al., 2008; Quinn et al., 2007; Yoshimura et al., 2008). Pax6 et VAB-3 régulent aussi les molécules d'adhésion cellulaire et c'est la perte de cette fonction qui est responsable de la migration perpétuelle des DTCs chez les mutants *vab-3(1769)*. En effet, une expression coordonnée des deux intégrines alpha est régulée par VAB-3 au cours du développement, avec d'abord celle de PAT-2 puis

ensuite celle d'INA-1, et est essentielle à la cessation de la migration au stade adulte (Meighan and Schwarzbauer, 2007).

1.4.6.2. La DTC est une cellule tentaculaire chez l'adulte

Chez l'adulte, la DTC n'est plus une cellule migratoire, mais reste néanmoins dynamique avec l'extension de multiples protrusions ressemblant à des tentacules à la surface basale des GSPG. Une étude de Wong et ses collègues a suivi la formation de ces extensions au cours du développement, révélant une croissance lente avec une vitesse qui varie entre ~1-10µm/hr et une longueur de 50 à 80 µm pour la plus longue extension (Wong et al., 2013). Deux observations suggèrent un mécanisme actif pour la croissance de ces extensions. Premièrement, une variabilité considérable existe entre les individus pour le rythme de croissance de ces extensions avec la présence notoire de pics sporadiques de croissance chez certains d'entre eux. Deuxièmement, ces extensions peuvent former différentes structures et embranchements qui se rétractent ou s'allongent de façon dynamique, suggérant qu'elles ne sont pas le simple fruit d'une extension membranaire passive de la DTC suite aux divisions des cellules souches sous-jacentes.

Une étude publiée en 2014 s'est intéressée à la morphologie de la partie la plus distale de la niche, dès lors nommée plexus (Byrd et al., 2014). Ce plexus regroupe le corps cellulaire de la DTC (nommé *cap*), l'embranchement distal des longues extensions enrobant la gonade et l'ensemble d'une population d'extensions visiblement plus petites et plus minces, présentes à l'intérieur de la gonade et s'intercalant entre les membranes latérales des CSGs (nommées *Shorth Intercalating Processes* ou SIP). Byrd et ses collègues ont constaté que ce plexus ne contacte que les 8 à 9 rangées les plus distales de cellules germinales, correspondant au « bassin réel de cellules souches » tel que défini par Cinquin et al. en 2010. L'architecture de ce plexus est sensible au signal Notch ou à la présence des CSGs puisque les mutants *glp-1(q224ts)* mis à température restrictive ont une morphologie altérée de ce plexus. Par contre, lorsque l'identité de CSG est maintenue chez les triples mutants *gld-3; nos-3; glp-1(q224ts)*, la morphologie du plexus reste similaire à celle observée chez les animaux de type sauvage. Les auteurs en ont conclu que la présence des CSGs, plutôt que la voie Notch, est déterminante

pour la morphologie de la partie distale de la niche. Par contre, lorsqu'ils ont quantifié l'étendue du plexus chez des mutants qui augmentent ou diminuent la longueur de la zone mitotique, ils ont obtenu des résultats en contradiction avec cette hypothèse. En effet, alors que les hétérozygotes *lag-2(+/-)* présentent une diminution conjointe de la longueur du plexus et de la zone mitotique, les mutants *fbf-1* et *fbf-2* ont respectivement une diminution et une augmentation de la zone mitotique qui ne s'accompagne pas de défauts morphologiques du plexus (Byrd et al., 2014).

Dès le commencement de ce deuxième projet de doctorat, j'ai moi aussi observé une morphologie anormale de la DTC dans des conditions où la lignée germinale est dépourvue de CSPG. Cependant, grâce à l'utilisation de divers mutants *glp-1*, j'ai pu démontrer que l'intégrité du récepteur Notch, exprimé par les CSPG, et sa liaison à Delta, exprimé par la niche, est probablement le réel gardien de l'architecture de celle-ci. La détermination de la fonction et de la formation des extensions émanant de la DTC s'inscrit dans le récent engouement pour la découverte d'une communication cellulaire à distance médiée par des structures cellulaires de type filopodia (Bischoff et al., 2013; Cohen et al., 2010; Renaud and Simpson, 2001; Rojas-Rios et al., 2012; Roy et al., 2014). De part leur nature transmembranaire, la majorité des ligands DSL et des récepteurs Notch restreignent le signal Notch à une interaction locale. Cependant, l'extension de protrusions membranaires permettrait de véhiculer ce type de molécules à distance et de coordonner l'activité de cellules répondant au signal Notch, même si elles sont éloignées de la source du ligand (Cohen et al., 2010; De Jossineau et al., 2003).

1.5. Implication de la polarité, de la division asymétrique et de la régulation de la niche dans les pathologies

1.5.1. La division asymétrique et la polarité intrinsèque comme gardiens de l'homéostasie tissulaire

La compréhension des mécanismes fondamentaux sous-jacents à la division asymétrique extrinsèque et intrinsèque semble majeure pour comprendre comment est maintenue l'homéostasie au sein des tissus adultes. En effet, la modulation du ratio entre division asymétrique et symétrique des cellules souches est un moyen efficace pour pallier à un soudain besoin croissant dans la production d'un type cellulaire particulier. C'est le cas durant le développement, lors des phases d'expansion neuronale et épithéliale, ou lors de la régénération tissulaire, quand la demande en cellules souches est grande et que l'augmentation des divisions symétrique permet d'y répondre (Morrison and Kimble, 2006). Hormis ces cas physiologiques, d'autres exemples montrent que la perte de division asymétrique, lorsqu'elle n'est pas régulée, peut favoriser le cancer. Les cellules souches qui perdent leur polarité perdent aussi l'habileté de spécifier le destin de leur descendance, laquelle est alors susceptible d'échapper à une régulation normale de son comportement. On parle de cellules souches cancéreuses lorsque ces cellules gagnent la capacité de proliférer anormalement et de résister à la mort cellulaire. Lorsqu'elles ne sont pas éliminées, ces cellules peuvent se multiplier en masses tumorales et éventuellement se disséminer à des sites ectopiques pour former des métastases.

L'un des exemples *in vivo* d'un tel lien entre perte de division asymétrique et tumorigénèse provient d'études effectuées chez le neuroblaste de la Drosophile. Dans ce modèle de cellule souche, la perte des déterminants spécifiant le destin GMC tel que Numb, Prospero, Miranda et Brat ou encore la perte de régulateurs spécifiant le domaine basal tel que Lgl entraîne une hyperprolifération des neuroblastes au dépend de la différenciation neuronale, causant la formation de tumeurs dans le cerveau des larves (Lee et al., 2006b). Le caractère métastatique de ces tumeurs a été démontré par des essais de transplantation dans l'abdomen de mouches sauvages, montrant que ces neuroblastes peuvent proliférer massivement et même

causer des tumeurs au sein de différents tissus, aboutissant à la mort de l'hôte en seulement deux semaines (Caussinus and Gonzalez, 2005).

Il est intéressant de constater que plusieurs régulateurs du cycle cellulaire jouent aussi le rôle de suppresseur de tumeur chez le neuroblaste, notamment à cause de leurs fonctions dans la polarisation des déterminants cellulaires (Lee et al., 2006a; Wang et al., 2007a; Wang et al., 2006). Cycline E est un exemple et apparaît comme un régulateur du destin cellulaire via la division asymétrique chez le GMC ainsi que chez l'embryon de *C. elegans* en plus de réguler l'auto-renouvellement des cellules souches germinales chez les vers adultes. La fonction ou l'expression des régulateurs du cycle cellulaire est souvent perturbée dans les cancers, conférant un avantage prolifératif aux cellules cancéreuses et générant de l'instabilité génétique et chromosomique (Keyomarsi and Herliczek, 1997; Malumbres and Barbacid, 2009; Mao et al., 2007). Considérant que ces régulateurs mitotiques affectent aussi un autre processus associé à la progression tumorale, soit la division asymétrique, il devient important de caractériser la dualité du rôle de ces protéines dans la polarité et le cycle cellulaire afin d'en faire des cibles thérapeutiques efficaces.

Plus récemment, une perte de division asymétrique chez des cellules souches et progénitrices issu de modèles de cancer mammifères a été mise en lumière par l'imagerie en temps réel. Ainsi, alors que les cellules souches du système hématopoïétique (Wu et al., 2007b), les progéniteurs des oligodendrocytes (Sugiarto et al., 2011) ainsi que les cellules souches de la glande mammaire (Cicalese et al., 2009) se divisent majoritairement par division asymétrique en temps normal, leur transformation en cellule cancéreuse, respectivement par l'expression d'un oncogène ou par la perte du gène suppresseur de tumeur, entraîne une augmentation considérable des divisions symétriques. Ensemble, ces données sont en accord avec l'hypothèse que la perte de division asymétrique puisse agir comme mécanisme de prolifération des cellules souches cancéreuses.

Enfin, l'implication des régulateurs de la polarité dans un autre mécanisme sous-jacent à la tumorigénèse, la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM) a longtemps été soupçonnée. Cette transformation cellulaire permet à des cellules épithéliales d'acquérir un caractère mésenchymateux, avec une perte de leur adhésion cellulaire et le gain d'une capacité migratoire. Il s'agit d'un processus normal, permettant la plasticité cellulaire requise à la

morphogénèse au cours du développement. Ce programme de TEM serait toutefois ré-initié dans certaines cellules cancéreuses, leur conférant un potentiel invasif (Thiery et al., 2009). Cependant, il reste incertain si ce potentiel est réellement un moyen efficace pour la formation des métastases (Macara and McCaffrey, 2013). De récentes évidences montrent que la TEM n'est pas le seul mécanisme par lequel les tumeurs peuvent se disséminer. Par exemple, la migration cellulaire sans intervention de la TEM promeut aussi l'invasion des cellules épithéliales dans différents modèles de cancer de la glande mammaire (McCaffrey et al., 2012; Xue et al., 2013). Cette invasion est favorisée par la perte de la protéine de polarité Par3. Celle-ci entraîne d'une part l'activation constitutive de Rac, causant des défauts de formation des jonctions serrées (Chen and Macara, 2005), et augmente d'autre part l'expression de métalloprotéines via l'activation de la voie JAK/STAT, ce qui permet la destruction de la MEC lors de l'invasion (McCaffrey et al., 2012). Ces données sont aussi accompagnées de l'analyse du patron d'expression de Par3 dans le cancer du sein, y révélant une diminution de son expression. D'autres régulateurs clé de la polarité, sont aussi des suppresseurs de tumeurs chez les mammifères. Par exemple, PAR-4/LKB1 est muté dans plusieurs cas de cancer pulmonaires ainsi que dans le syndrome Peutz-Jeghers, une maladie génétique qui engendre le développement de plusieurs polypes intestinaux et gastriques, prédisposant les patients atteints à certains types de cancers. LKB1 permet aussi de maintenir l'homéostasie au sein du compartiment des cellules hématopoïétiques en favorisant la quiescence et la survie des cellules souches hématopoïétiques (Gan et al., 2010; Gurusurthy et al., 2010; Nakada et al., 2010)

1.5.2. Les différentes facettes de relation niche/cellule souche et ses liens avec le cancer

Enfin, l'étude de la relation niche-cellule souche promet aussi d'être une avenue intéressante à explorer dans le traitement du cancer. Outre la formation de tumeurs germinales causées par l'hyperprolifération des CSGs lorsque les signaux de la niche sont dérégulés (Fitzgerald and Greenwald, 1995; Xie and Spradling, 1998), de récentes observations rendent compte du caractère dynamique de la relation niche-cellule souche comme mécanisme potentiel de la formation et de la dissémination des tumeurs. Par exemple, il a été démontré

chez la *Drosophile* que des cellules souches germinales qui ne peuvent pas se différencier, se comportant alors comme des cellules souches cancéreuses, peuvent entrer en compétition avec les cellules souches normales pour se greffer à la niche endogène. Elles envahissent alors l'espace de la niche pour y recevoir des signaux favorisant leur prolifération (Jin et al., 2008). Toujours chez la *Drosophile*, les cellules souches régulent la formation de leur niche via la voie de signalisation Notch et une augmentation dans l'activation de cette voie génère la formation de niches ectopiques fonctionnelles. Ceci démontre que les cellules souches sont capables de générer leur propre microenvironnement pour favoriser leur prolifération à des sites ectopiques *in vivo* (Ward et al., 2006). Enfin des études chez *C. elegans* ont permis de montrer que les cellules de support de la niche, favorisant la prolifération des CSPG seulement chez les stades larvaires, peuvent agir comme des niches latentes chez l'adulte si elles établissent un contact inapproprié avec les cellules souches. Ceci mène à la formation de tumeurs germinales, démontrant que l'organisation spatio-temporelle de l'environnement somatique des cellules souches est un élément important pour le maintien de l'homéostasie (McGovern et al., 2009). L'ensemble de ces études montre que le microenvironnement des cellules souches est régulé par plusieurs composants, y compris les cellules souches elles-mêmes, mettant en perspective un système beaucoup plus complexe que celui de la typique communication unidirectionnelle entre la niche et les cellules souches. Cette thèse adresse les liens unissant cycle cellulaire et division asymétrique ainsi que la nature bidirectionnelle de la communication niche-cellules souches dans le but d'approfondir les connaissances fondamentales sur ces processus qui sont affectés dans le cancer.

1.6. Objectifs de la thèse

L'objectif général du premier projet de doctorat présenté au chapitre 2 était de déterminer le rôle de deux cyclines B dans la régulation de la division asymétrique chez l'embryon de *C. elegans*. Les objectifs spécifiques étaient les suivants :

1- Déterminer si la perte de ces deux cyclines pouvait supprimer la létalité des mutants *par-2* en supprimant les défauts de polarité chez ces mutants.

2-Déterminer si la régulation de la polarité par CYB-2.1, CYB-2.2 faisait intervenir une régulation des événements du cycle cellulaire, tels que la progression méiotique et mitotique qui sont concomitants à l'établissement et au maintien de la polarité.

3-Déterminer comment CYB-2.1, CYB-2.2 pouvait affecter la localisation des protéines PAR antérieures par des techniques de biologie moléculaire et par des essais génétiques.

J'ai montré que CYB-2.1, CYB-2.2, et CDK-1 régulent spécifiquement la polarité en stabilisant les niveaux protéiques de PAR-6 chez l'embryon.

L'objectif général du deuxième projet était de déterminer comment les changements morphologiques de la niche des cellules souches germinales (CSGs) de *C. elegans* étaient orchestrés au cours du développement. Les objectifs spécifiques étaient les suivants :

1-Déterminer la nature structurelle des extensions membranaires de la niche.

2-Déterminer le rôle des CSGs et du récepteur Notch qu'elles expriment à leur surface dans la croissance de ces extensions.

3-Déterminer l'élément clé initiant la croissance des extensions chez l'adulte.

J'ai montré que la croissance des extensions dépendait de Notch, mais pouvait impliquer une fonction non canonique de ce récepteur.

CHAPITRE 2

2. CDK-1 and two B-type cyclins promote PAR-6 stabilization during polarization of the early *C. elegans* embryo

Alexia Rabilotta¹, Marianne Desrosiers¹, Jean-Claude Labbé^{1,2}

¹Institute of Research in Immunology and Cancer (IRIC), and ²Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

Corresponding author:
Jean-Claude Labbé
Institute for Research in Immunology and Cancer
Université de Montréal
C.P. 6128, Succ Centre-ville
Montréal, QC H3C 3J7
Canada

Short title: Cyclin B/CDK-1 regulation of *C. elegans* embryonic polarity

Keywords: Embryonic polarity; Asymmetric cell division; Cell cycle regulation; cyclin B/Cdk complex; Cullin-based regulation; PAR-6 stability.

2.1. Contribution des co-auteurs

Ma contribution à cet article est de près de 100%. J'ai effectué toutes les expériences et analyses à l'exception de celle montrée dans la Figure 2.2 qui a été effectuée par Marianne Desrosiers. J'ai écrit le manuscrit en collaboration avec Jean-Claude Labbé.

Cet article a été publié dans: PLoS One 2015 Feb 6;10(2):e0117656 PMID:25658117

2.2. Abstract

In the *C. elegans* embryo, formation of an antero-posterior axis of polarity relies on signaling by the conserved PAR proteins, which localize asymmetrically in two mutually exclusive groups at the embryonic cortex. Depletion of any PAR protein causes a loss of polarity and embryonic lethality. A genome-wide RNAi screen previously identified two B-type cyclins, *cyb-2.1* and *cyb-2.2*, as suppressors of *par-2(it5ts)* lethality. We found that the loss of *cyb-2.1* or *cyb-2.2* suppressed the lethality and polarity defects of *par-2(it5ts)* mutants and that these cyclins act in cell polarity with their cyclin-dependent kinase partner, CDK-1. Interestingly, *cyb-2.1; cyb-2.2* double mutants did not show defects in cell cycle progression or timing of polarity establishment, suggesting that they regulate polarity independently of their typical role in cell cycle progression. Loss of both cyclin genes or of *cdk-1* resulted in a decrease in PAR-6 levels in the embryo. Furthermore, the activity of the cullin CUL-2 was required to achieve suppression of *par-2* lethality when both cyclins were absent. Our results support a model in which CYB-2.1/2/CDK-1 antagonize CUL-2 activity to promote stabilization of PAR-6 levels during polarization of the early *C. elegans* embryo. They also suggest that CYB-2.1 and CYB-2.2 contribute to the coupling of cell cycle progression and asymmetric segregation of cell fate determinants.

2.3. Introduction

Asymmetric cell division allows the unequal partitioning of cell fate determinants and is thus an essential process during development of all metazoa. The *C. elegans* embryo is a well-suited model to study the regulation of asymmetric division. The first division of the P₀ zygote is asymmetric and results in two daughter cells that differ in size and fate: the larger, anterior AB blastomere, precursor of most of the ectoderm, and the smaller, posterior P₁ blastomere that will give rise to all of the endoderm and the germ line. The second division of the embryo is also asymmetric and asynchronous between AB and P₁, with AB entering mitosis before P₁. This asymmetry requires the establishment and maintenance of an antero-posterior axis of polarity through asymmetric distribution of the conserved PAR polarity proteins (Figure 2.1; (Goldstein and Macara, 2007; Kemphues and Strome, 1997)). While PAR-2 contains a RING finger domain typically found in E3 ubiquitin ligases, PAR-3 and PAR-6 are PDZ domain-containing proteins that can form a complex with the atypical protein kinase PKC-3 (Etemad-Moghadam et al., 1995; Hung and Kemphues, 1999; Levitan et al., 1994; Moore and Boyd, 2004; Tabuse et al., 1998). Establishment of embryonic polarity is triggered after the completion of maternal meiosis. It occurs via a polarized cortical flow of acto-myosin that moves cortical PAR-3, PAR-6 and PKC-3 proteins to the anterior cortex, and a concomitant microtubule-dependent deposition of PAR-2 to the posterior cortex, which results in the asymmetric enrichment of the protein kinase PAR-1 at the posterior pole (Cuenca et al., 2003; Motegi et al., 2011; Munro et al., 2004). Maintenance of respective PAR protein cortical domains relies on their mutual cortical exclusion, a process that is thought to depend on the kinase activity of the PAR-1 and PKC-3 proteins (Hao et al., 2006; Motegi et al., 2011) and on proper stoichiometry between anterior and posterior PAR proteins (Boyd et al., 1996; Goehring et al., 2011a). Proper localization of PAR proteins in the zygote is essential for the appropriate partitioning of all anterior and posterior cell fate determinants into the two daughter cells. Accordingly, depletion of any PAR protein leads to a loss of polarity, abnormal symmetric cell divisions and embryonic lethality (Kemphues and Strome, 1997).

In embryos produced by *par-2* mutant animals (hereafter referred to as *par-2* mutant embryos), anterior PAR proteins are inappropriately localized at the posterior cortex, posterior displacement of the mitotic spindle at metaphase/anaphase is impaired and the embryo divides

into two cells that are equal in size and fate and that will enter their second mitosis simultaneously (Boyd et al., 1996; Kemphues et al., 1988). A genome-wide RNAi screen for suppressors of *par-2(it5ts)* lethality previously uncovered genes that are or could be regulators of the anterior PAR complex (Hyenne et al., 2008; Labbé et al., 2006; Pacquelet et al., 2008). Two of these suppressors are *cyb-2.1* and *cyb-2.2* (together referred to as *cyb-2.1/2*). *cyb-2.1/2* encode nearly identical *C. elegans* homologs of B-type cyclins that, along with CYB-1 and CYB-3, control meiotic and mitotic progression in the embryo (van der Voet et al., 2009). In other organisms, B-type cyclins regulate cell cycle progression by interacting with a cyclin-dependent kinase (Cdk) partner, thus providing substrate specificity to the cyclin/Cdk complex. The assembly/disassembly of a functional cyclin B/Cdk1 complex during cell cycle is regulated in part by cyclin B protein levels, which rise during the G2 and M phases and drop at the metaphase-to-anaphase transition (Sullivan and Morgan, 2007). A previous analysis of *C. elegans* B-type cyclins function revealed that CYB-1 and CYB-3 are necessary for proper meiotic and mitotic progression in the early embryo, but that the phenocopy of CDK-1 loss of function can only be achieved after depletion of all four B-type cyclins (van der Voet et al., 2009). In this study, no apparent cell cycle defect was observed after depletion of CYB-2.1/2, suggesting that CYB-1 and CYB-3 are the major regulators of cell cycle progression and can compensate for the loss of CYB-2.1/2 in this process. Interestingly, previous studies have suggested a role for key cell cycle regulators such as PLK-1, SPAT-1 and CDC-25 in asymmetric division of the *C. elegans* embryo (Budirahardja and Gönczy, 2008; Noatynska et al., 2010; Rivers et al., 2008). However, although cell cycle defects were previously coupled to a loss of normal polarity establishment in the early embryo (Liu et al., 2004; Shakes et al., 2003; Sonnevile and Gönczy, 2004), it remains unclear whether cell cycle regulators directly control cell polarity and asymmetric cell division.

In this study, we found that loss of *cyb-2.1* and *cyb-2.2*, either singly or together, suppresses the lethality and polarity defects of *par-2(it5ts)* thermosensitive mutants without affecting the timing of *C. elegans* embryonic divisions, uncovering a new and specific role for these B type cyclins in cell polarity. Using molecular and genetic approaches, we demonstrate that CYB-2.1 and CYB-2.2 antagonize CUL-2 to regulate PAR-6 levels and cell polarity in parallel to NOS-3. Our results also suggest that these two B-type cyclins act in polarity with

their associated kinase, CDK-1. Our results support a mechanism in which cell cycle and cell polarity are distinctly regulated but temporally coupled, by regulators such as CYB-2.1 and CYB-2.2, to ensure the accurate spatiotemporal segregation of cell fate determinants before asymmetric division.

2.4. Materials and Methods

2.4.1. Strains and alleles

Strains were maintained as described by Brenner (Brenner, 1974) and grown at 15°C unless otherwise stated. The wild-type strain was the Bristol N2 strain. The alleles used in this study were LGI: *cyb-2.2(tm1969)*; LGII: *nos-3(q650)*; LGIII: *cdk-1(ne2257ts)*, *par-2(it5ts)*, *cul-2(or209ts)*, *unc-119(ed3)*; LGIV: *cyb-2.1(tm2027)*; LG?: *xnIs3[Ppar-6::par-6::gfp; unc-119(+)]*, *ltIs37[Ppie-1::mCherry::his-58; unc-119(+)]*, *zuIs45[Pnmy-2::nmy-2::gfp; unc-119(+)]*.

The *cyb-2.1(tm1969)* and *cyb-2.2(tm2027)* alleles respectively have a 638bp and 424bp deletion in the promoter and 5' region of each gene. Quantitative RT-PCR analysis of transcript levels from each locus revealed that they are found in trace levels in mutant animals (Figure 2.2 and see below), supporting the notion that both alleles are null. Double, triple and quadruple mutants were generated by genetic crosses and genotypes were assessed either visually by phenotypic scoring or molecularly by PCR, using pairs of primers specific to each locus.

2.4.2. Quantitative RT-PCR analysis

Young wild-type adults or *cyb-2.1/2* mutant adults were rinsed in M9 buffer (22 mM KH₂PO₄, 42 mM Na₂HPO₄, 85 mM NaCl, 1 mM MgSO₄) and lysed in Trisol (Gibco) by repeated thawing followed by Trisol-chloroform extraction. RNA was purified from these extracts using the RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendation. The quantity and purity of RNA samples was validated using ThermoFisher's NanoDrop and Agilent's Bioanalyzer instruments (Nano Chip). After DNase treatment, first strand cDNA was synthesized with random primers using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was then performed with the PerfeCTa SYBR Green SuperMix (Quanta BioSciences) using a Vii7 real-time cycler instrument (Life Technologies). Melting curve analysis was performed after the final cycle to examine the specificity of each reaction and a no-template control was done for every primer pair. Two primer pairs were designed to amplify common

regions in *cyb-2.1* and *cyb-2.2* (pair 1: TTGTCTCCAAGGCGGAAT + GGCAAGTAAATATCTTCGAATTTGG, and pair 2: GATTCGGTCATGTCTACGGTT + GATGCAGCAGTCTTCGGATTA), and one primer pair specific for *cyb-1* (pair 3: AGATGGCTAAGCACGGAAAC + TTTCGACTGGAGCTGGATTG). Endogenous controls were performed using primer pairs specific for *cdc-42* (CTGCTGGACAGGAAGATTACG + CTCGGACATTCTCGAATGAAG) and *pmp-3* (GTTCCCGTGTTTCATCACTCAT + ACACCGTCGAGAAGCTGTAGA) as described previously (Hoogewijs et al., 2008). For each assay, a standard curve was performed to ensure a 90-110% range in efficacy. Three independent extracts were analyzed in duplicate for each genotype. Relative gene expression for each sample was normalized to that of endogenous controls using the $RQ=2^{-\Delta\Delta CT}$ equation in the Expression Suite software (Life Technologies). Error bars correspond to the ratio of RQmin over RQmax ($2^{(RQ-SEM)} / 2^{(RQ+SEM)}$) using a 95% confidence interval.

2.4.3. Lethality suppression assays

Protein depletion by RNAi feeding was performed as described previously (Kamath et al., 2003) using individual clones from Julie Ahringer's library. All clones were verified by sequencing. Clone C32E12.1 was used as RNAi control since it has no effect on embryonic development and does not suppress *par-2(it5)* defects (Labbé et al., 2006). Suppression assays on all mutant backgrounds were performed in triplicates as described previously (Hyenne et al., 2008). Briefly, 15-20 L4 animals were transferred to a plate seeded with either OP50 bacteria or HT115 bacteria expressing dsRNA, depending on the assay, and the plate was incubated at the desired temperature for 24h. Nine animals were then transferred to three plates prepared like the first one (3 worms per plate) and allowed to lay eggs for an additional 16h before they were removed. The plates were kept at the same temperature for a minimum of 24h to allow completion of embryonic development. Hatching frequency was assessed by counting the number of unhatched eggs over the total number of progeny on each plate.

2.4.4. Time-lapse microscopy

The timing of early embryonic events was assessed by differential interference contrast microscopy. Embryos were mounted and time-lapse images were acquired every 5 seconds with a Zeiss Axio-Imager Z1 microscope, as described previously (Benkemoun et al., 2014). Spindle orientation and positioning was determined by measuring the position of the two centrosomes along the antero-posterior axis as described previously (Hyenne et al., 2008). Nuclear envelope breakdown and cortical ingression at cytokinesis were scored by visual inspection.

Time-lapse imaging of fluorescent specimens was done with a CoolSnap HQ² camera (Photometrics) mounted on a Nikon Swept Field Confocal microscope (Nikon Canada, Mississauga, ON, Canada; and Prairie Technologies, Madison, WI, USA) and using a 63X objective (Chartier et al., 2011). To assess the velocity of cortical NMY-2::GFP flows during the polarization phase, 16 confocal sections (each separated by 0.5 μm) were acquired at the upper cortex and the anterior displacement of NMY-2::GFP foci over time was measured by kymograph analysis as described previously (Chartier et al., 2011). Analyses were performed using Image J software (NIH).

2.4.5. Immunofluorescence

For immunofluorescence analysis, embryos were fixed in methanol and stained as described previously (Benkemoun et al., 2014). Images were acquired using a Zeiss LSM 510 confocal microscope. The primary antibodies used were rabbit anti-PAR-6 (1/50, (Hyenne et al., 2008)) and mouse P4A1 anti-PAR-3 (1/150, Developmental Studies Hybridoma Bank). Secondary antibodies were Alexa488-coupled goat-anti-rabbit and Alexa546-coupled goat-anti-mouse (1/500 each, Invitrogen). The cortical distribution of PAR-3 and PAR-6 proteins was measured using Image J software by plotting fluorescence intensity values of a 10 pixel-thick line drawn around the entire cortex of the embryo. This produced a fluorescence intensity profile where a broad peak of intensity corresponding to the entire anterior cortex is bordered by regions of low/background intensity in the posterior pole. The two points on each side of the broad peak where fluorescence intensity starts to rise were considered as PAR

protein cortical boundaries and were determined as the intersection between the average fluorescence intensity of the posterior cortex and that of the slopes on each side of the peak. PAR protein domain size in each embryo was expressed as the distance between the anterior pole and the average of the two intersecting points relative to embryo length.

2.4.6. Western blot analyses

To assess PAR-6 levels, synchronized animals were grown at 15°C until they reached the L4 stage and were then transferred to 20°C for 24 hrs. Animals were collected in M9 buffer and embryos were recovered by sodium hypochlorite treatment. Extracts were obtained by grinding embryos in liquid nitrogen and resolved by SDS-PAGE. Western blot analysis was performed as described previously (Hyenne et al., 2008) on three extracts prepared independently, and three blots were made for each extract. The primary antibodies were rabbit anti-PAR-6 (1/500, (Hyenne et al., 2008)) and mouse anti-tubulin (DM1A, 1/5000, Sigma). Secondary antibodies were HRP-coupled goat anti-mouse and goat anti-rabbit (1/10000, Bio-Rad).

2.5. Results

2.5.1. *cyb-2.1* and *cyb-2.2* are suppressors of *par-2(it5ts)* lethality and polarity defects

Depletion of *cyb-2.1* or *cyb-2.2* by RNAi suppresses *par-2(it5ts)* embryonic lethality at the semi-restrictive temperature of 22°C (Figure 2.3A; (Labbé et al., 2006)). However, *cyb-2.1* and *cyb-2.2* share 97% identity in their nucleotide sequence, making them effective co-targets in RNAi assays. To determine whether *cyb-2.1* and *cyb-2.2* function redundantly in polarity, we generated double and triple mutants between *par-2(it5ts)* and null alleles for each cyclin-encoding gene (see Materials and Methods and Figure 2.2) and tested the resulting effect on embryonic viability. While 7% of embryos produced by *par-2(it5ts)* animals (hereafter referred to as *par-2* mutant embryos) at the semi-restrictive temperature of 22°C were viable, animals double mutant for *par-2(it5ts)* and either *cyb-2.1(tm1969)* or *cyb-2.2(tm2027)* respectively produced 54% and 60% of viable progeny (Figure 2.3B). Viability was significantly higher for *cyb-2.2(tm1969); par-2(it5ts); cyb-2.1(tm2027)* triple mutant embryos with 88% hatching frequency, revealing an additive effect on *par-2(it5ts)* suppression when both cyclins are removed (Figure 2.3B). Similar results were obtained when animals were grown at the fully restrictive temperature of 25°C, where the 45% hatching frequency of triple mutant embryos was statistically additive when compared to either double mutant condition (Figure 2.3B).

par-2 mutant embryos show cellular defects consistent with a loss of polarity such as central mitotic spindle positioning at the first embryonic division and loss of cell cycle asynchrony between AB and P₁ divisions (Boyd et al., 1996; Kemphues et al., 1988). These polarity defects were partially suppressed in double and triple mutants for *par-2*, *cyb-2.1* and/or *cyb-2.2* at the semi-restrictive temperature of 22°C, and in the triple mutant at the restrictive temperature of 25°C (Figure 2.3C-F). Together, these results indicate that both CYB-2.1 and CYB-2.2 function in embryonic polarity during asymmetric division of *C. elegans par-2* mutant embryos.

2.5.2. CYB-2.1 and CYB-2.2 function with CDK-1 in embryonic polarity

Cyclins typically regulate cell cycle progression by interacting with a specific Cdk partner, providing substrate specificity for the phosphorylation of distinct targets. To ask if CYB-2.1 and CYB-2.2 function with CDK-1 to regulate embryonic polarity, we used animals mutant for the thermosensitive *cdk-1(ne2257)* allele to determine if CDK-1 has a role in embryonic polarity. The *ne2257* allele was previously shown to code for a protein bearing an isoleucine/phenylalanine substitution at residue 173, within the T loop of the kinase domain, that retains normal kinase activity *in vitro* (Shirayama et al., 2006). Embryos mutant for *cdk-1(ne2257)* failed to hatch when grown at restrictive temperature, however they were reported to achieve normal cell divisions during development (Shirayama et al., 2006). As the penetrance of lethality and polarity defects was similar between *par-2(RNAi)* and *par-2(it5ts)* mutant animals raised at restrictive temperature, we used RNAi to deplete PAR-2 from *cdk-1(ne2257)* embryos, to avoid the complications of working with two temperature-sensitive alleles. We found that at the temperature of 16°C, at which 95% of *cdk-1(ne2257)* embryos hatched, the *cdk-1(ne2257)* allele restored the viability of *par-2(RNAi)* embryos and suppressed *par-2(RNAi)*-related polarity defects in a manner similar to *cyb-2.2; cyb-2.1* double mutants (Figure 2.4). These results support the notion that CYB-2.1 and CYB-2.2 regulate polarity through their activity as part of a cyclin/Cdk complex.

We next asked if the suppression of *par-2(RNAi)* phenotypes in *cyb-2.2; cdk-1; cyb-2.1* triple mutants was additive or equal to that in *cyb-2.1/2* and *cdk-1* mutants but found that their combined effect was not additive for suppression of lethality and loss of asynchrony in *par-2(RNAi)* embryos. Rather, we observed a slight increase in embryonic lethality for the triple mutant treated with control(RNAi) and no suppression when treated with *par-2(RNAi)* (Figure 2.4). This suggests that there is a threshold of cyclin/Cdk1 activity below which embryonic development is perturbed, and that suppression of *par-2(RNAi)* requires a level of CDK-1 activity higher than that needed to allow most embryos to complete embryogenesis.

2.5.3. CYB-2.1 and CYB-2.2 regulate anterior PAR protein localization

Since *par-2* depletion results in a loss of PAR protein asymmetry, we next tested the effect of CYB-2.1/2 on PAR protein localization in the early embryo. In wild-type embryos undergoing mitosis, anterior PAR proteins are restricted to the anterior cortex, occupying ~50% of embryo length (Figure 2.5A-B). In *par-2(it5ts)* mutants grown at restrictive temperature, PAR-3 and PAR-6 localization is displaced towards the posterior cortical pole, each occupying ~75% of embryo length (Figure 2.5B). Mutating *cyb-2.1* and *cyb-2.2* suppressed this defect and restored PAR-3 and PAR-6 cortical distribution to 61% and 60% of embryo length, respectively (Figure 2.5B). While, *cyb-2.2; cyb-2.1* double mutant embryos themselves displayed a small but statistically significant anteriorization of cortical PAR-3 and PAR-6 proteins during M phase compared to wild-type embryos (Figure 2.5C-D), *cdk-1* mutant embryos did not show this phenotype (Figure 2.5D). These results indicate that the effect of *cyb-2.1/2* loss-of-function on PAR protein localization is modest, but effectively manifests itself when polarity is compromised.

2.5.4. CYB-2.1 and CYB-2.2 regulate polarity independently of cell cycle progression

Embryonic polarization initiates after the meiosis-to-mitosis transition, a cell cycle-dependent event governed by B-type cyclins and CDK-1 (Figure 2.1) (Boxem et al., 1999; Burrows et al., 2006; Liu et al., 2004; Sonnevile and Gönczy, 2004). As cell cycle perturbations were previously reported to result in polarity defects (Shakes et al., 2003), this raised the possibility that CYB-2.1/2 and CDK-1 could regulate polarity through their activity in controlling cell cycle progression. To address this, we monitored the timing and progression of several cellular events in embryos mutant for *cyb-2.1/2* or *cdk-1*. We found that the initiation, duration and velocity of cortical acto-myosin flows were unchanged in *cyb-2.1/2* mutants compared to control, indicating that CYB-2.1/2 do not impinge on cytoskeleton-dependent polarizing events or on the timing of polarity initiation following meiosis II

anaphase (Figure 2.6). We also found that the duration of mitotic progression during the first two divisions of *cyb-2.1/2* mutant embryos was equal to that of wild-type embryos (Figure 2.7A), and there was no cumulative cell cycle progression defect in *cyb-2.1/2* mutant embryos, as the initiation of epidermal enclosure in wild-type and *cyb-2.1/2* mutants occurred in both cases ~5 hours after the second embryonic division (as scored in 8 embryos each, data not shown). We conclude that mutating *cyb-2.1* and *cyb-2.2* does not impair cell division timing and can suppress the defects of *par-2* mutants without perturbing cell cycle progression.

Analysis of *cdk-1* mutants grown at 16°C revealed mild defects in cell cycle progression and in spindle positioning during the first embryonic division (Figure 2.7A-B). However, other polarity-related phenotypes, such as the cell cycle asynchrony between AB and P₁ divisions and the progression of pronuclear migration, were normal in these embryos indicating, as reported previously (Shirayama et al., 2006), that polarity is not overly compromised (Figure 2.7C). Similar defects for *cdk-1* mutant embryos were observed at 20°C, at which 67% of *cdk-1(ne2257)* embryos hatched, although cell cycle asynchrony at the 2-cell stage was significantly decreased as compared to wild-type embryos grown at this temperature (Figure 2.7). These results indicate that, contrary to disruption of *cyb-2.1/2*, the *cdk-1(ne2257)* allele results in mild but significant defects in cell cycle progression.

All four *C. elegans* B-type cyclins were previously shown to function semi-redundantly in the regulation of cell cycle progression (van der Voet et al., 2009). We therefore asked whether depleting the two other cyclins, CYB-1 and CYB-3, could suppress the lethality of *par-2* mutants. We found that depletion of CYB-1 by RNAi caused perturbations in cell cycle progression and resulted in embryonic lethality in wild-type embryos, but did not restore proper spindle orientation and positioning in *par-2* mutants (Figure 2.8). The increase in cell cycle asynchrony observed in CYB-1-depleted *par-2* mutants could be a consequence of CYB-1 depletion itself, as it has a similar effect on cell cycle asynchrony in wild-type embryos. Depleting CYB-3 did not suppress the embryonic lethality of *par-2* mutants (data not shown). These results indicate that perturbing cell cycle progression by depleting other cyclins is not sufficient to suppress the phenotypes of *par-2* mutants. As *cyb-2.1/2* double mutants display suppression of *par-2* phenotypes but have normal cell cycle

progression, these results also indicate that CYB-1 and/or CYB-3 can compensate for the cell cycle activity of CYB-2.1/2 but not for their role in cell polarity.

2.5.5. CYB-2.1/2 and CDK-1 regulate PAR-6 levels through the Cullin CUL-2, but independently of NOS-3

Previous results have revealed that regulation of PAR protein levels is an effective mean to regulate PAR protein distribution and cell polarity (Goehring et al., 2011a; Labbé et al., 2006; Watts et al., 1996). Indeed, PAR-6 levels are actively regulated *in vivo* by a Cullin-based E3 ubiquitin ligase pathway that can modulate PAR protein distribution (Pacquelet et al., 2008). As PAR-3 and PAR-6 distribution is affected in *cyb-2.1; cyb-2.2* double mutants, we asked whether PAR-6 levels are reduced in these animals. We first determined whether suppression of *par-2*(RNAi) lethality by mutations in *cyb-2.1/2* or *cdk-1* was affected in animals that overexpress PAR-6::GFP, as done previously (Pacquelet et al., 2008). We found that while the embryonic lethality caused by PAR-2 depletion was strongly reduced in animals mutant for *cyb-2.1/2* or *cdk-1*, it was not reduced in the same mutants overexpressing PAR-6::GFP (Figure 2.9A). Furthermore, western blot analyses of embryonic extracts revealed that PAR-6 protein levels were significantly decreased in *cyb-2.1/2* and *cdk-1(ne2257)* mutants, to 57% and 63% of wild-type levels, respectively (Figure 2.9B and Figure 2.10). These levels are comparable to what was observed in embryos mutant for *nos-3*, a known suppressor of *par-2* lethality and regulator of PAR-6 levels in *C. elegans* (Figure 2.9B; (Labbé et al., 2006; Pacquelet et al., 2008). These results indicate that CYB-2.1/2 and CDK-1 are required to maintain high levels of PAR-6 in the early embryo.

The levels of PAR-6 protein were previously proposed to depend on proteasome-mediated degradation following ubiquitination by an E3 ubiquitin ligase complex composed of the Cullin subunit CUL-2, the co-activators FEM-2 and FEM-2 and the substrate recognition subunit FEM-1 (Pacquelet et al., 2008; Starostina et al., 2007). To determine if CYB-2.1/2 regulate PAR-6 levels through the CUL-2 pathway, we asked if *cyb-2.1/2*-dependent suppression of *par-2*(RNAi) lethality depends on the presence of CUL-2. CUL-2 activity was modulated by using animals mutant for the thermosensitive *cul-2(or209)* allele, which produce 80% of viable progeny at permissive temperature (Figure 2.11A; (Burger et al., 2013)). While

embryonic viability was 72% in *cyb-2.1; cyb-2.2* double mutants depleted in PAR-2, we observed 12% embryonic viability in *cyb-2.2; cul-2; cyb-2.1* triple mutants depleted of PAR-2. This severe decrease in embryonic viability is significantly higher than that observed in *cyb-2.2; cul-2; cyb-2.1* triple mutant animals treated with control(RNAi) (67%; Figure 2.11A). We conclude that CUL-2 activity is necessary for suppression of *par-2* embryonic lethality by *cyb-2.1/2* and that CYB-2.1/2 may regulate PAR-6 levels through CUL-2.

NOS-3 was previously shown to regulate PAR-6 levels through CUL-2 activity, perhaps by regulating the translation of the FEM-3 co-activator (Pacquelet et al., 2008). We therefore used genetic analysis to determine if CYB-2.1/2 function through NOS-3 in the polarity pathway. While *par-2(it5ts)* animals produced no viable progeny at restrictive temperature, embryonic viability in *nos-3; par-2* double mutants and *cyb-2.2; par-2; cyb-2.1* triple mutants was 23% and 29%, respectively. Embryonic viability in *cyb-2.2; nos-3; par-2; cyb-2.1* quadruple mutants increased to 53%, a value statistically additive between that of the double and triple mutant animals (Figure 2.11B). Based on the additive nature of this interaction, we conclude that CYB-2.1/2 act with CUL-2 but independently of NOS-3 to regulate PAR protein-dependent polarity.

2.6. Discussion

In this study, we reported that two homologs of B-type cyclins, CYB-2.1 and CYB-2.2, and their associated kinase CDK-1 have a role in PAR protein-dependent cell polarity. Mutations in *cyb-2.1/2* and *cdk-1* suppressed the lethality of *par-2* mutants and decreased PAR-6 protein levels in the embryo. Epistatic analysis revealed that the role of *cyb-2.1/2* in polarity depends on *cul-2*, suggesting that CYB-2.1 and CYB-2.2 regulate PAR-6 degradation, likely through a CUL-2 based E3 ubiquitin ligase complex. A previous study has shown that NOS-3, another suppressor of *par-2*, also controls the levels of PAR-6 in the embryo through a CUL-2-based ubiquitin complex that uses FEM-2 and FEM-3 as co-activators and FEM-1 as substrate-specific adaptor (Pacquelet et al., 2008). Interestingly, while our results are consistent with this model, we found that CYB-2.1/2 regulate PAR-6 levels independently of NOS-3. Together with other studies on regulators of PAR-6 levels (Beatty et al., 2013; Goehring et al., 2011a; Hyenne et al., 2008; Pacquelet et al., 2008), our work highlights a network of molecular and genetic interactions that tightly controls PAR-6 levels during polarization of the early *C. elegans* embryo (Figure 2.11C).

Our results favor a model in which NOS-3 and CYB-2.1/2 have different targets in the regulation of PAR-6 degradation. NOS-3 is a known translational repressor of FEM-3, suggesting that it regulates the activity of the Cullin complex by regulating FEM-3 levels (Kraemer et al., 1999; Pacquelet et al., 2008). In this study, we did not find the direct target of the CYB-2.1/2/CDK-1 complex in polarity. As a master post-translational regulator during mitosis, CDK-1 could possibly regulate PAR-6 levels directly or indirectly through phosphorylation. Mass spectrometry analysis of PAR-6 immunoprecipitated from embryonic extracts revealed two phosphorylation sites and one potential ubiquitination site on the protein. However, mutating each of these sites did not perturb PAR-6 localization in the embryo and transgenic expression of each mutant proteins was sufficient to rescue *par-6(RNAi)* embryonic lethality (data not shown). While the target(s) of CDK-1 in the *C. elegans* polarity pathway remains unknown, the role of this master kinase in the regulation of polarity protein stability was previously observed in other cell types. For example, phosphorylation of the human Discs large homologue 1 (DLG1) protein by CDK1 was shown to affect its susceptibility to ubiquitination (Narayan et al., 2009).

CDK-1 was previously implicated in the degradation of OMA-1, an embryonic cell fate determinant whose proteolysis occurs after completion of the first division and, like PAR-6, was proposed to require CUL-2 activity (Lin, 2003; Shirayama et al., 2006). CDK-1 thus functions as a negative regulator for PAR-6 degradation and a positive regulator for OMA-1 proteolysis. One difference that may explain this distinct outcome for each protein could be linked to the cyclin partner with which CDK-1 impinges on each process, as PAR-6 stability depends on CYB-2.1/2 whereas OMA-1 responds to CYB-3 (Shirayama et al., 2006). The CUL-2 complexes regulating PAR-6 and OMA-1 stability function via distinct co-activators and substrate-specific adaptors (Shirayama et al., 2006; Starostina et al., 2007), and CDK-1 could also act directly on the CUL-2 E3 ligase complex to modify its activity or substrate specificity through one of these adaptors, for instance by differential regulation of a subunit like FEM-1 that contains a Cdk1 consensus phosphorylation site. Understanding whether different cyclins provide substrate specificity or control the activity of the cyclin B/Cdk1 complex, and whether this directly modulates the activity of the CUL-2 complex during embryonic polarization will require further investigation.

Previous studies have revealed a role in *C. elegans* embryonic polarity for a number of mitotic regulators including PLK-1, SPAT-1 and components of the APC complex (Budirahardja and Gönczy, 2008; Noatynska et al., 2010; Rivers et al., 2008; Shakes et al., 2003). As inactivation of these proteins greatly affects cell cycle progression, it remained unclear if the effect of these mutations on cell polarity were a direct consequence of cell cycle defects. While CYB-2.1 and CYB-2.2 were previously shown to participate in the control of cell cycle progression during *C. elegans* embryogenesis (van der Voet et al., 2009), we found that *cyb-2.1/2* mutant embryonic blastomeres have wild-type cell cycle timing. This indicates that the two other B-type cyclins, CYB-1 and CYB-3, can compensate for the loss of CYB-2.1/2 activity in the regulation of cell cycle progression but not cell polarization. This uncoupling could be due to a different threshold requirement in cyclin B/Cdk1 activity for these two processes. This notion is supported by our finding that *par-2*(RNAi) lethality was not suppressed in *cyb-2.1/2; cdk-1* triple mutants and is further compatible with findings made in *Drosophila* neuroblasts, where the asymmetric localization of the polarity proteins Inscuteable and Prospero was shown to depend on a threshold of cyclin B/Cdk1 activity that is

higher than the one required for cell division (Tio et al., 2001). Alternatively, the uncoupling between cell cycle progression and cell polarization observed in *cyb-2.1/2* mutants could point to a specific involvement of CYB-2.1/2 in cell polarity. Interestingly, while depleting CYB-1 resulted in severe cell cycle defects, consistent with its main involvement in meiotic and mitotic progression (van der Voet et al., 2009), it did not restore viability or polarity in *par-2* mutants, and neither did CYB-3 depletion. These results indicate that perturbing cell cycle progression does not systematically lead to the suppression of *par-2* defects, further suggesting an uncoupling between these two cellular processes.

2.7. Acknowledgements

We are grateful to the Japanese National Bioresource Project for *C. elegans*, the *Caenorhabditis* Genetics Center, Andy Golden (NIH, Bethesda, USA), and Julien Burger and Lionel Pintard (Institut Jacques Monod, Paris, France) for strains and reagents. We also thank Carl Laflamme, Abigail Gerhold and members of the Labbé laboratory for helpful discussions and comments on the manuscript, Ken Lam and Pierre Thibault (IRIC), and Shaolin Li and Richard Roy (McGill University, Montréal, Canada) for technical assistance, and Christian Charbonneau and Raphaëlle Lambert of IRIC's Bio-imaging and Genomics Facilities for technical help with image acquisition and qPCR analysis, respectively.

2.8. Figures

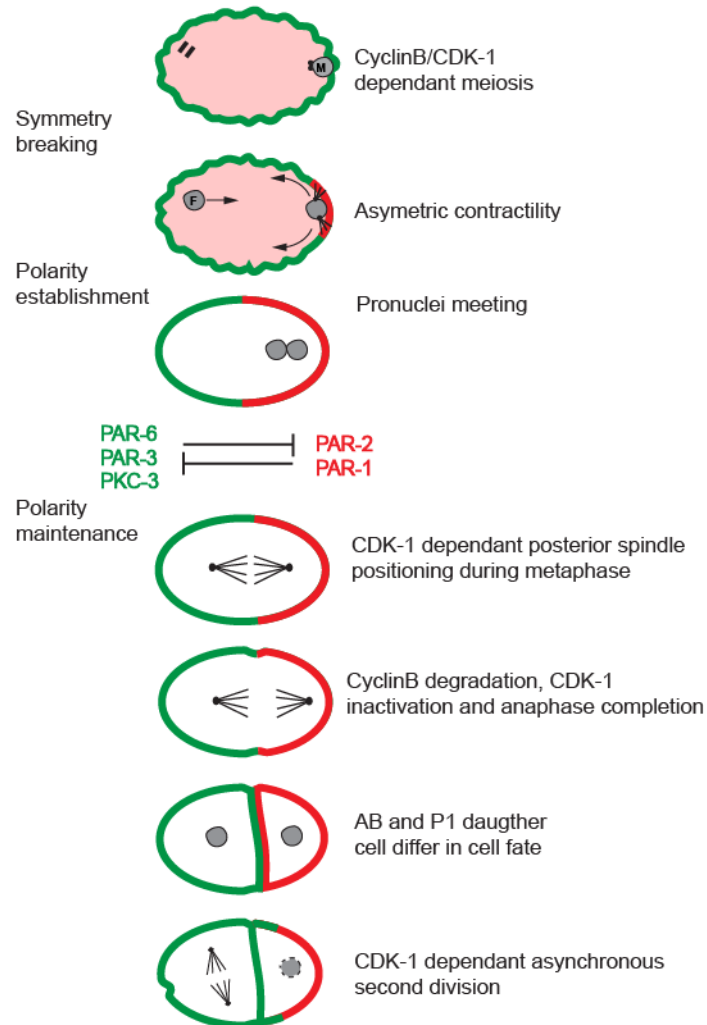


Figure 2.1 : Schematic representation of PAR protein-dependent polarity establishment and maintenance during *C. elegans* early embryogenesis.

The distribution of anterior (PAR-3, PAR-6, PKC-3, in red) and posterior (PAR-1, PAR-2, in green) PAR proteins is depicted during the first two divisions of embryonic blastomeres. In all images, anterior is to the left. M=male pronucleus; F=female pronucleus. See main text for details.

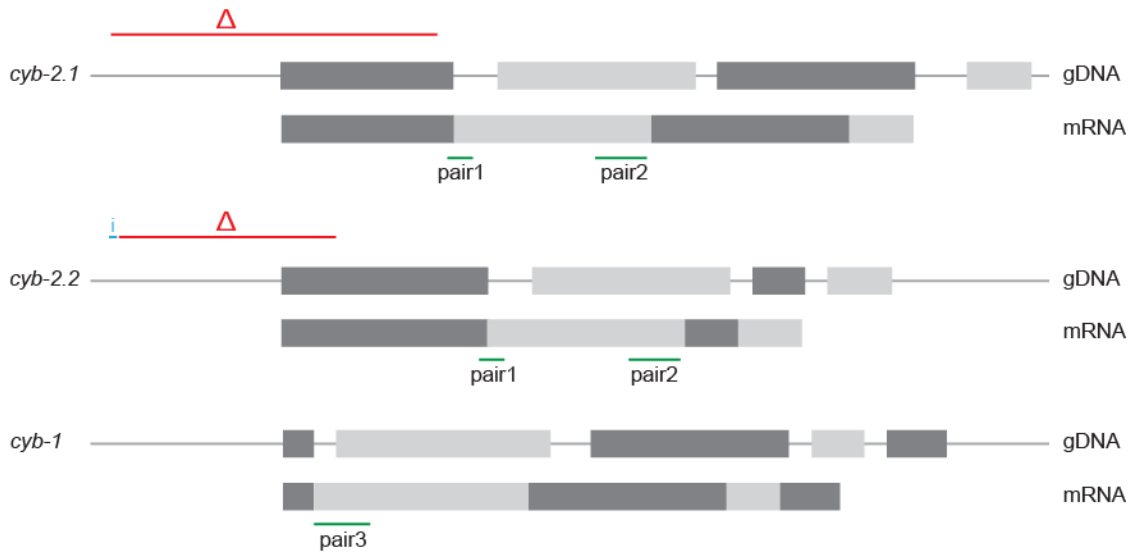
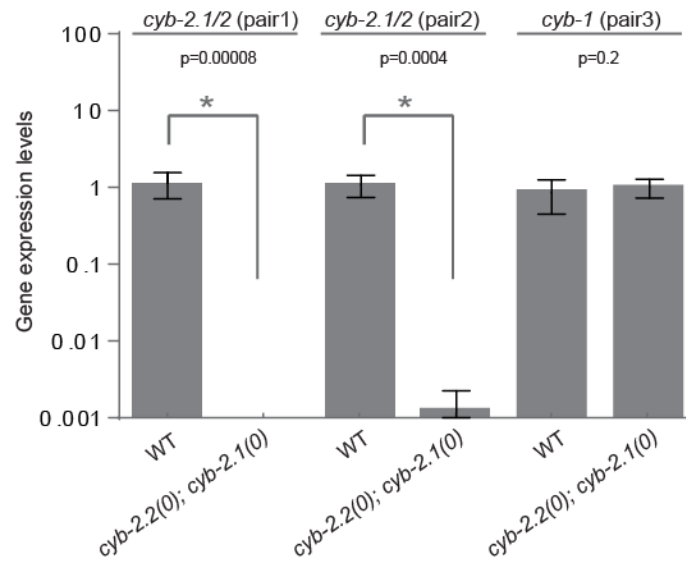
A**B**

Figure 2.2 (Figure S1): Quantitative transcriptional analysis at the *cyb-2.1* and *cyb-2.2* loci in wild-type and *cyb-2.1/2* double mutant animals.

A) Schematic organization of the *cyb-2.1* (top), *cyb-2.2* (middle) and *cyb-1* (bottom) loci and exon cDNA produced from each transcribed mRNA. Exons are depicted as light or dark grey boxes and non-coding regions (promoters, introns, flanking sequences) as lines. Position of deletions for the *cyb-2.1(tm2027)* and *cyb-2.2(tm1969)* alleles are depicted in red and the regions amplified by qPCR with each primer pair are shown in green. B) Relative gene expression ratios averaged from three biological samples for each strain. Bars indicate the 95% confidence interval of the mean (non-overlapping intervals denote significant differences at the 0.05 level). In each strain, expression levels of cyclin genes were normalized to the mean expression of *cdc-42* and *pmp-3*.

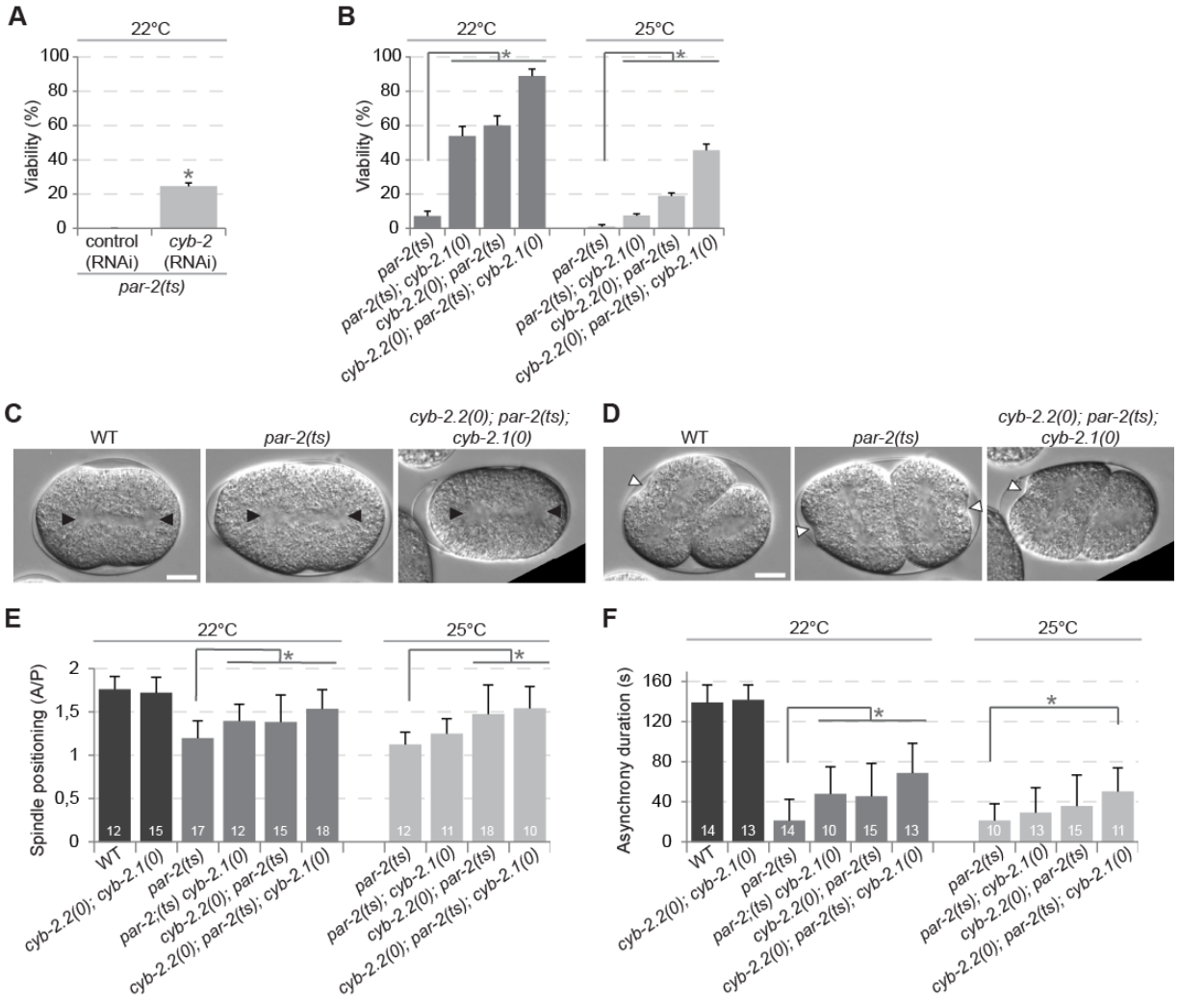


Figure 2.3 Depletion of *cyb-2.1* and *cyb-2.2* suppresses the lethality and polarity defects associated with the loss of *par-2*.

(A-B) Graphs reporting the viability of embryos of the specified genotypes after RNAi (A) or genetic (B) inactivation of *cyb-2.1* and *cyb-2.2*. The values correspond to the mean percentage of hatching embryos over the total number of embryos \pm SEM over three independent assays performed at the specified temperature. (C-D) DIC images from time-lapse movies of embryos grown at 22°C undergoing first (C) or second (D) division. Black arrowheads indicate centrosome positions and white arrowheads point to sites of membrane ingression during cytokinesis. In all panels, anterior is to the left. Scale bar is 10 μ m. (E-F) Graphs reporting the measurements for spindle position (E) and asynchrony duration (F) in embryos of the specified genotypes grown at the specified temperatures. Spindle position is expressed as a ratio of the distance between the anterior centrosome and the anterior cortex over the distance between the posterior centrosome and the posterior cortex (A/P ratio). Asynchrony duration corresponds to the time difference between the appearance of membrane ingression in AB and in P₁. Error bars represent standard deviation over the specified number of events (n). In all panels, asterisks indicate statistical significance with control animals ($p \leq 0.05$, Student's t-test).

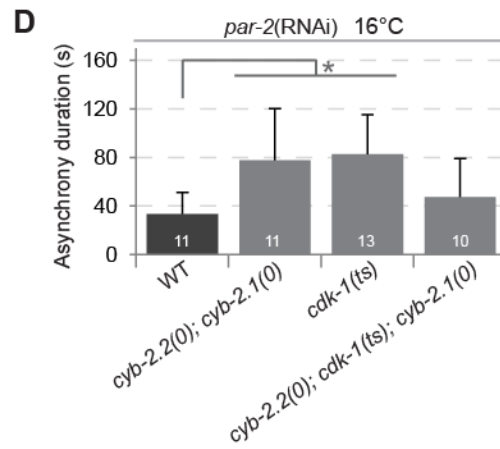
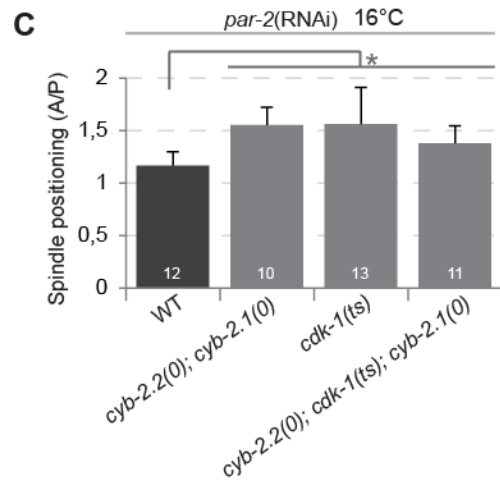
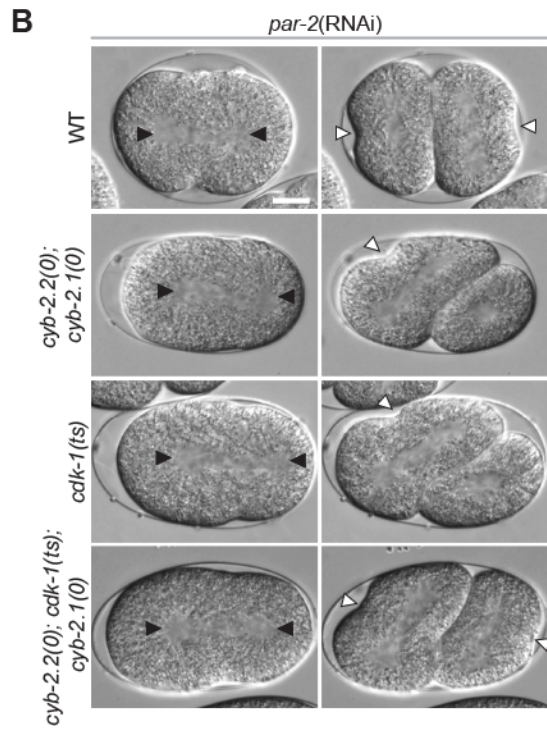
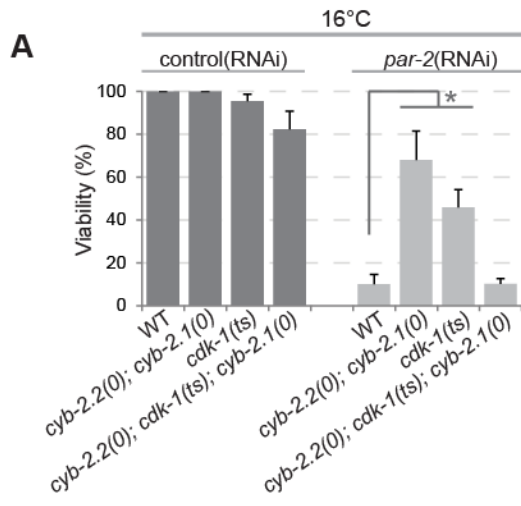


Figure 2.4 Mutation in the cyclin B-associated kinase CDK-1 suppresses *par-2*(RNAi) lethality and polarity defects.

(A) Graph reporting the viability of embryos of the specified genotypes after control(RNAi) or *par-2*(RNAi) treatment. The values correspond to the mean percentage of hatching embryos over the total number of embryos \pm SEM over three independent assays performed at 16°C. (B) DIC images from time-lapse movies of *par-2*(RNAi)-depleted embryos grown at 16°C undergoing first (left) and second (right) division. In all panels, anterior is to the left. Scale bar is 10 μ m. Black arrowheads indicate centrosome positions and white arrowheads point to sites of membrane ingression during cytokinesis. (C-D) Graphs reporting the measurements for spindle position (C) and asynchrony duration (D) in embryos of the specified genotypes grown at 16°C. Error bars represent standard deviation over the specified number of events (n). In all panels, asterisks indicate statistical significance with control animals ($p \leq 0.05$, Student's t-test).

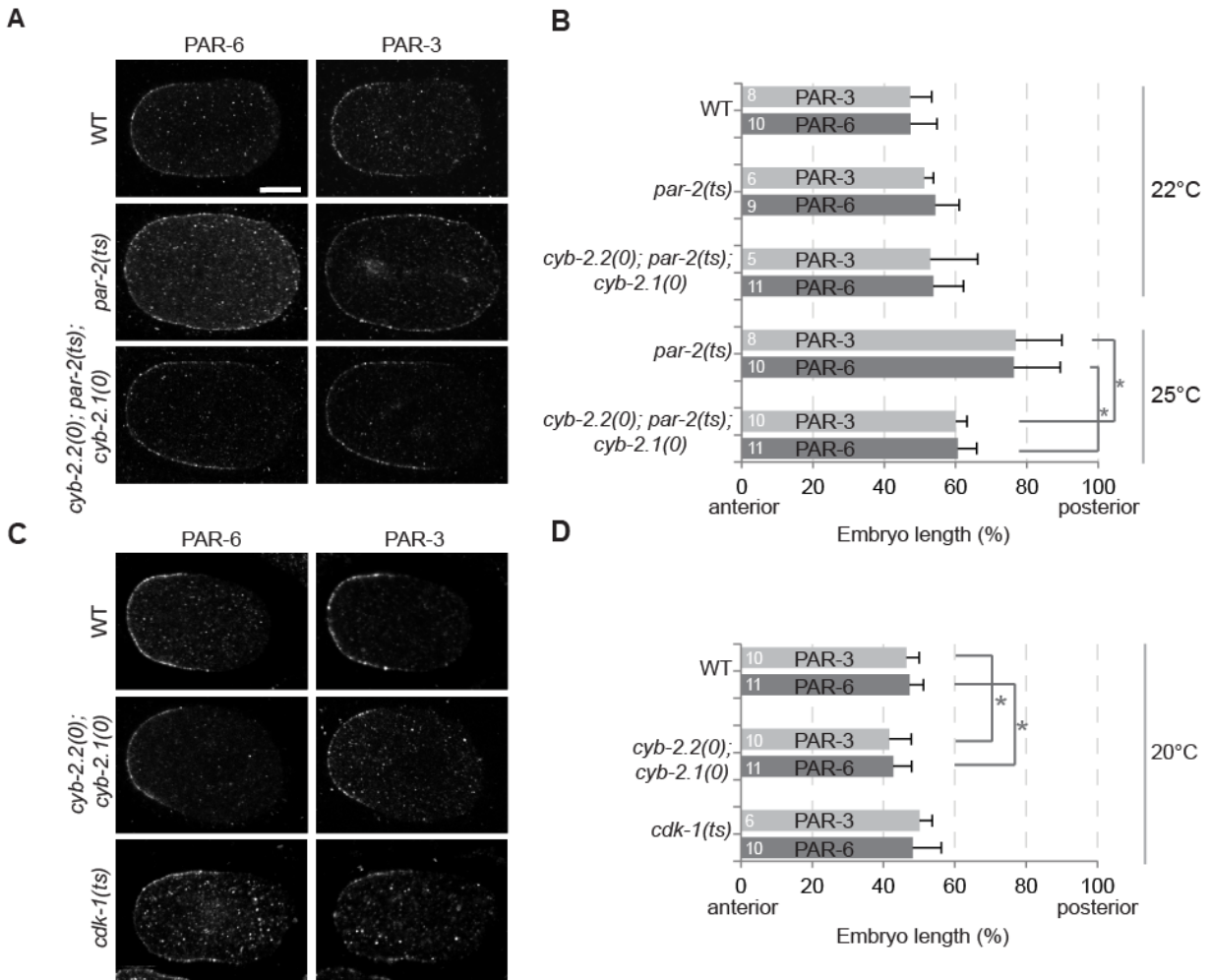


Figure 2.5 CYB-2.1/2 affect anterior PAR protein localization in the 1-cell embryo.

(A, C) Images of embryos of the specified genotypes grown at 25°C (A) or 20°C (C), fixed during mitosis and stained with anti-PAR-6 (left panels) or anti-PAR-3 (right panels) antibodies. In all panels, anterior is to the left. Scale bar is 10 μ m. (B, D) Graphs reporting the cortical distribution (in % embryo length) of endogenous PAR-6 and PAR-3 along the antero-posterior axis in embryos of the specified genotypes grown at 22°C, 25°C (B) or 20°C (D) and fixed during mitosis. Error bars represent standard deviation over the specified number of events (n). In all panels, asterisks indicate statistical significance with control animals ($p \leq 0.05$, Student's t-test).

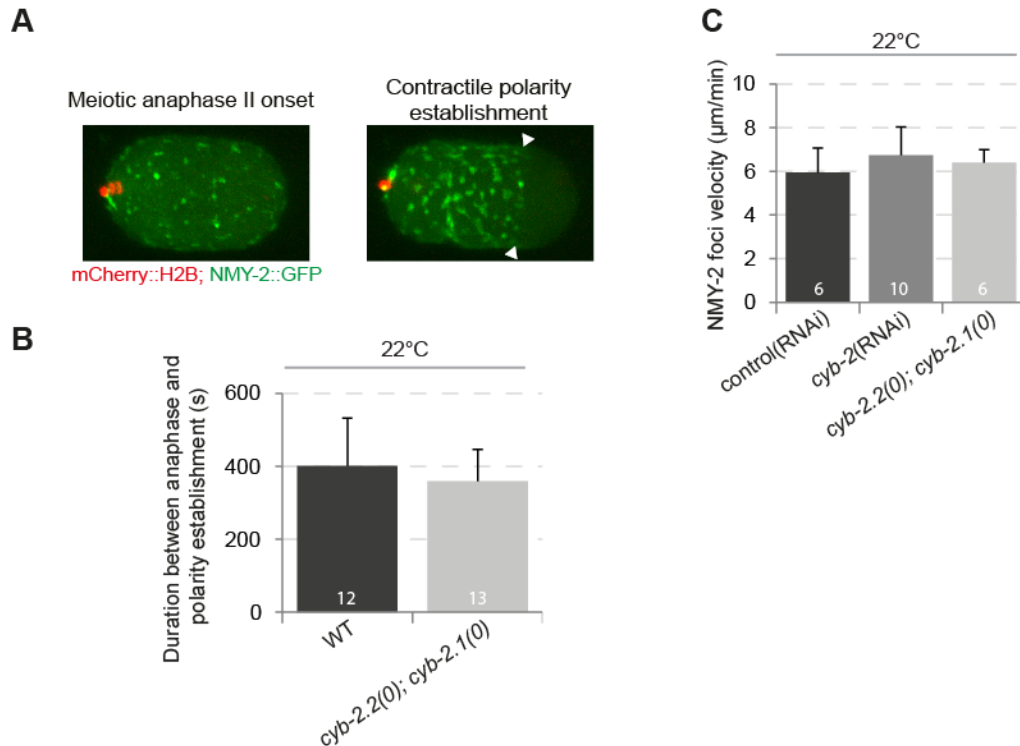


Figure 2.6 (Figure S2) CYB-2.1/2 do not regulate the timing or velocity of acto-myosin-dependent cortical flows.

(A) Fluorescence images from time-lapse movies of control embryos undergoing meiosis II anaphase (left) and polarity establishment (right) and expressing NMY-2::GFP (green) and mCherry::H2B (red). White arrowheads point to the cortical domain boundary that is devoid of NMY-2::GFP. (B-C) Graphs reporting the time between meiotic II anaphase onset and contractile polarity establishment (B) and the velocity of NMY-2::GFP foci (C) in embryos of the specified genotypes grown at 22°C. Error bars represent standard deviation over the specified number of events (n). Values were not statistically different from control animals ($p > 0.05$, Student's t-test).

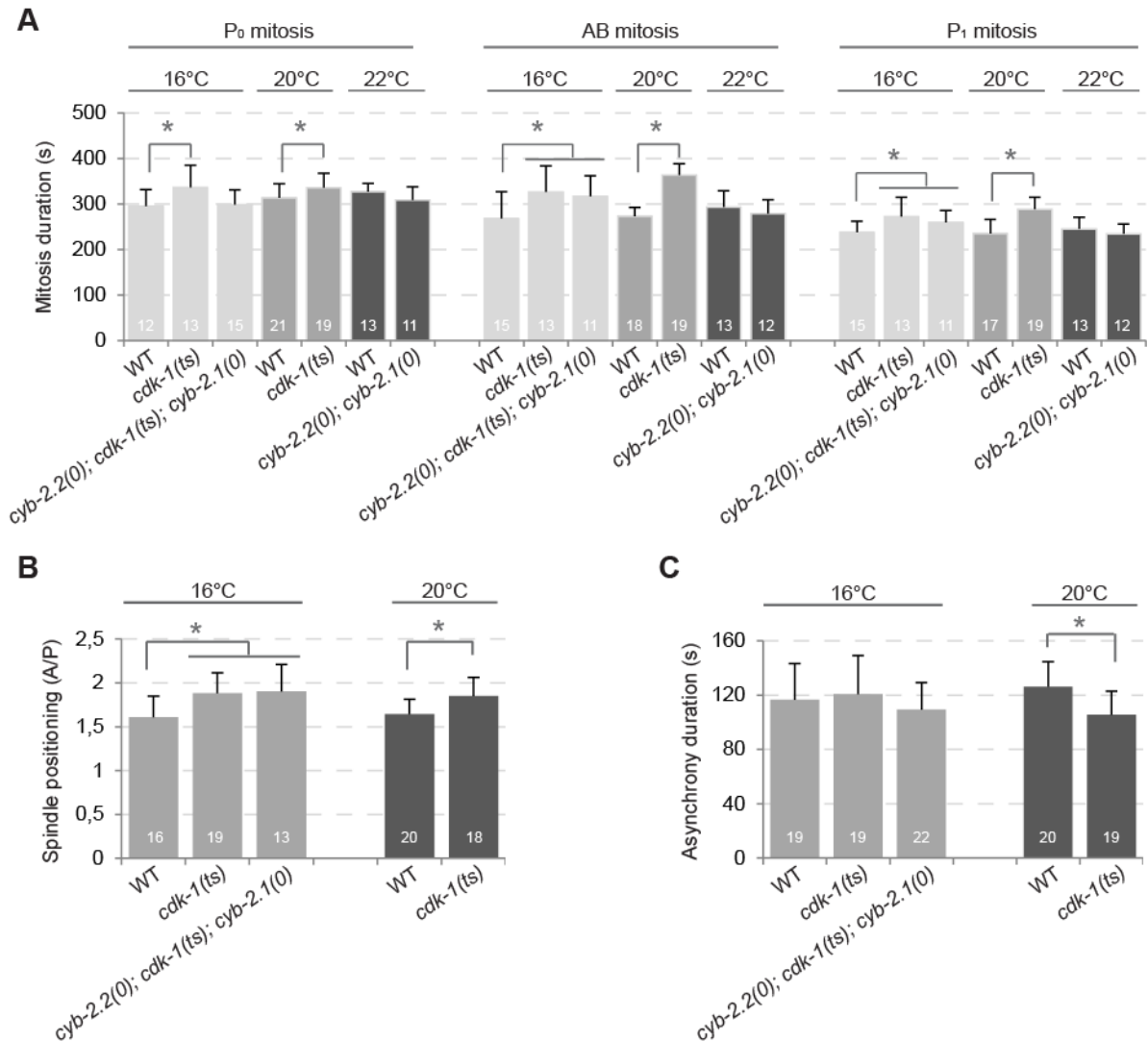


Figure 2.7 (Figure S3) Cell cycle durations and polarity-related phenotypes in *cyb-2.1/2* and *cdk-1* mutant embryos.

(A-C) Graphs reporting the duration of mitosis during the first two embryonic divisions (A), the measurements in 1-cell embryos of spindle positioning (B) and duration of asynchrony (C) in animals of the specified genotypes grown at the specified temperature. Error bars represent the standard deviation over the specified number of events (n). In all panels, asterisks indicate statistical significance with control animals ($p \leq 0.05$, Student's t-test).

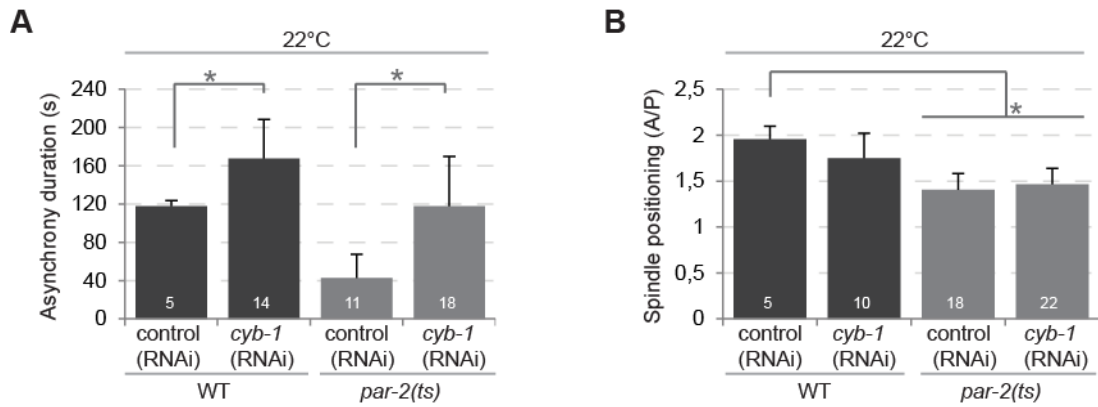


Figure 2.8 (Figure S4) Depletion of CYB-1 does not restore embryonic polarity in *par-2* mutants.

(A-B) Graphs reporting the measurements of spindle positioning (A) and duration of asynchrony (B) in 1-cell embryos of the specified genotypes grown at 22°C. Error bars represent the standard deviation over the specified number of events (n). In all panels, asterisks indicate statistical significance with control animals ($p \leq 0.05$, Student's t-test).

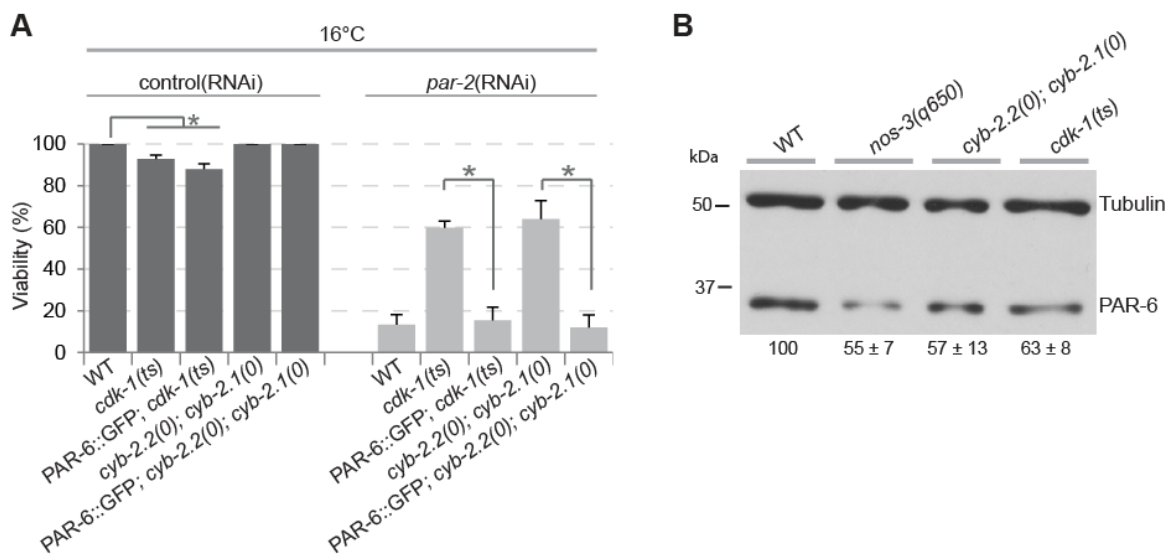


Figure 2.9 CYB-2.1/2 and CDK-1 regulate PAR-6 levels in the early embryo.

(A) Graph reporting the viability of embryos of the specified genotypes after control(RNAi) or *par-2*(RNAi) treatment. The values correspond to the mean percentage of hatching embryos over the total number of embryos \pm SEM over three independent assays performed at 16°C.

(B) Western blot analysis of extracts from embryos of the specified genotypes grown at 20°C and revealed with anti-PAR-6 and anti-alpha-tubulin antibodies. The value under each lane corresponds to the ratio of PAR-6 over alpha-tubulin intensity \pm SEM in three independent experiments, with the mean value normalized to WT levels.

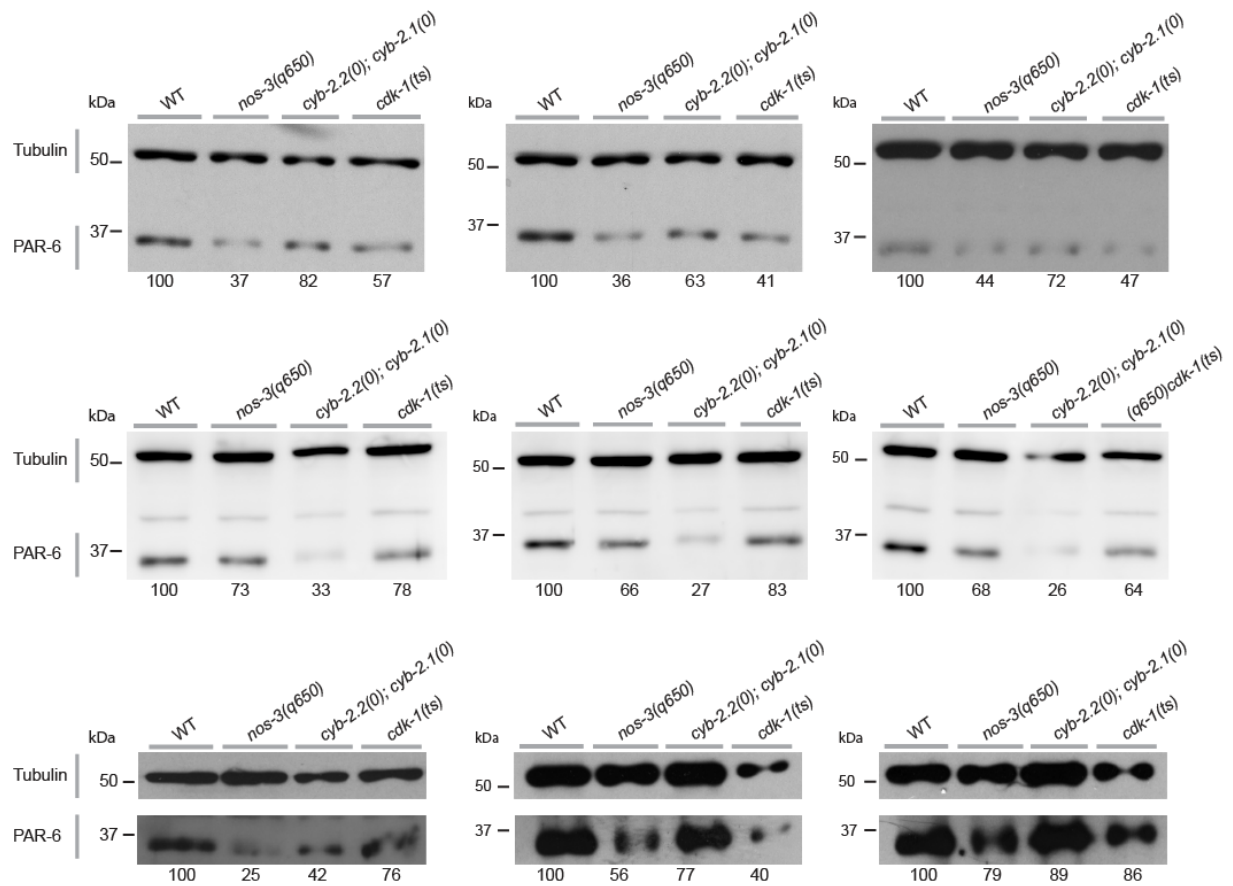


Figure 2.10 (Figure S5) Analysis of PAR-6 levels in various embryonic extracts.

Western blot analyses of embryonic extracts from animal of the specified genotype grown at 20°C and revealed with anti-PAR-6 and anti-alpha-tubulin antibodies. For each genotype, three extracts were prepared independently (top, middle, bottom) and each extract was probed in three separate western blot analyses (left, middle, right). The value under each lane corresponds to the ratio of PAR-6 over alpha-tubulin intensity normalized to tubulin levels in wild-type extracts. A different, longer exposure of the western blot shown in the top left was used for Figure 2.9.

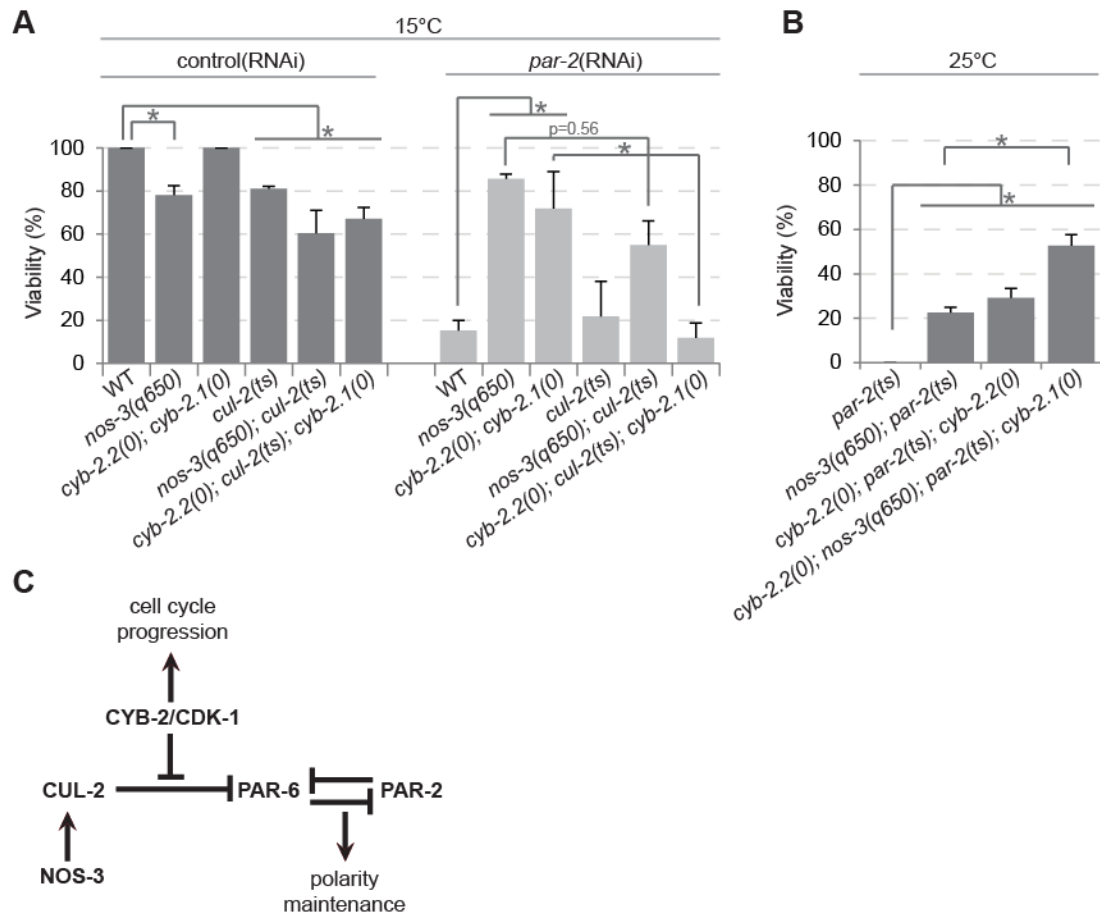


Figure 2.11 CYB-2.1/2 act with the Cullin CUL-2 but independently of NOS-3 in the embryonic polarity pathway.

(A-B) Graph reporting the viability of embryos of the specified genotypes after control(RNAi) or *par-2*(RNAi) treatment. The values correspond to the mean percentage of hatching embryos over the total number of embryos \pm SEM over three independent assays performed at 15°C (A) or 25°C (B). In all panels, asterisks indicate statistical significance with control animals ($p \leq 0.05$, Student's t-test) (C) Model depicting the proposed dual role of CYB-2.1/2/CDK-1 in the regulation of cell polarity and cell cycle progression during asymmetric division of the *C. elegans* embryo (see discussion for details).

CHAPITRE 3

3. Germline stem/progenitor cells regulate their niche morphology through the Notch receptor in *C. elegans*

Alexia Rabilotta¹, Paul S. Maddox³, Jean-Claude Labbé^{1,2}

¹Institute of Research in Immunology and Cancer (IRIC), and ²Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

³Department of Biology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA

Corresponding author:
Jean-Claude Labbé
Institute for Research in Immunology and Cancer
Université de Montréal
C.P. 6128, Succ Centre-ville
Montréal, QC H3C 3J7
Canada

Short title: Germline stem cell and the regulation of the niche morphology by Notch

Keywords: Germline stem/progenitor cells, DTC processes, niche, Notch, GLP-1, VAB-3

3.1. Contribution des co-auteurs

Ma contribution à cet article est de 100%. J'ai effectué toutes les expériences et analyses et j'ai écrit le manuscrit en collaboration avec Jean-Claude Labbé. Ce manuscrit est en préparation.

3.2. Abstract

During post-embryonic development, tissue generation, maintenance and repair rely on the capacity of stem cells to modulate their balance between self-renewal and differentiation, mostly in response to their microenvironment or niche. However, little is known about how the cellular environment can in turn influence the niche. In *C. elegans*, a single somatic distal tip cell (DTC), located at the distal part of the gonad, acts as a niche for the germline stem cells (GSCs). Maintenance of a pool of mitotic undifferentiated germ cells is mediated by Notch signaling, through expression of Delta-like ligands by the DTC and expression of Notch receptor by the germline stem/progenitor cells (GSPCs). Interestingly, the shape of the DTC is modified during development, displaying membrane processes at adulthood. We found that the morphological changes experienced by the DTC can be modulated by two master transcriptional regulators: the Notch homologue GLP-1 and the Pax6 homologue VAB-3. Interestingly, GLP-1 does not mediate its effect through its canonical GLD-1/GLD-2 dependent pathway. Our findings highlight the existence of a bi-directional communication between *C. elegans* stem/progenitor cells and their niche that depends on a new function for Notch rather than on germ cell state.

3.3. Introduction

Stem cells are essential for generating and maintaining cell diversity and tissue homeostasis throughout development and in the adult life of multicellular organisms. They typically acquire their self-renewal potential by interacting with their microenvironment or niche. The germline of the nematode *C. elegans* is a well-characterized, powerful system to study the relationship between a niche and its related stem cells *in vivo*. The *C. elegans* germline stem cell niche is a single mesenchymal cell called the distal tip cell (DTC) and is located at the distal tip of each of the two gonad arms. It closely associates with the most distal germ cells that generate progenitors through self-renewal mitotic divisions, in a region called the mitotic zone. Previous experiments showed that the DTC is both necessary and sufficient to maintain the germline stem/progenitor cell (GSPC) pool in adults (Kidd et al., 2005; Kimble and White, 1981; Kipreos et al., 2000).

Each U-shaped *C. elegans* gonad arm is organized linearly, with mitotic self-renewal divisions at the distal end and meiotic differentiation into gametes at the proximal end. All germ cells derive from two precursors, Z_1 and Z_2 , that are formed during embryogenesis and remain mitotically quiescent until favorable growth conditions are encountered by the newly hatched L1 larvae. These cells then proliferate through mitotic divisions and, from the L3 larval stage to the end of adult life, the most proximal germ cells enter meiotic differentiation, first as sperm and then as oocytes. During larval development, the total number of germ cell expand to reach 2000 cells in adult hermaphrodites and this massive expansion is accompanied by a concomitant elongation of the gonad during which the DTC plays a predominant role as a migrating cell (Crittenden et al., 2006; Hedgecock et al., 1987; Killian and Hubbard, 2005; Kimble and White, 1981).

The DTC activates Notch signaling to maintain GSPC cell fate by expressing the Delta-like ligand LAG-2, whereas GSPCs express the Notch receptor GLP-1 (Crittenden et al., 1994; Henderson et al., 1994). GLP-1 negatively regulates the expression of specific RNA binding proteins, including the mitotic repressor GLD-1 and the meiosis promoting factor GLD-2, to promote the mitotic fate and block the meiotic fate in the distal gonad (Crittenden et al., 2002; Eckmann et al., 2004; Hansen et al., 2004b; Wang et al., 2002). It was proposed

that a decreasing gradient of Notch signaling is sensed by the GSPCs as they divide and are pushed away from the niche, until a certain threshold is reached and triggers the decision to differentiate. While this possibility has not been tested directly, the DTC morphology changes drastically during development, from a smooth crescent cell in larval stages to a highly arborized cell that extend processes containing LAG-2 at adulthood (Hall et al., 1999; Henderson et al., 1994; Kimble and White, 1981). Because Notch signaling from the DTC relies on membrane bound receptors and ligands this observation suggests that the signaling from the niche could be differentially sensed by the germ cells during the expansion or maintenance phases of GSPC pool. This hypothesis remains however highly speculative since neither the mechanism of formation nor the function of the DTC processes are yet understood.

A recent study proposed that specific niche structures could maintain GSCs identity and that in turn, the morphological changes experienced by DTC are influenced by the GSPCs cell fate (Byrd et al., 2014). Consistently, we found that there is a bidirectional communication between the niche and the GSPCs that ensure the integrity of the DTC morphology. We provide evidences that the DTC processes are microtubules-dependent structures which formation depends on expression of a proper Notch receptor by underlying germ cells. However, in contrast to previous finding, our results suggest that the role of Notch in regulating the niche morphology is independent from the canonical *gld-1/gld-2* pathway which typically regulates germ cell state. We also found that at least one other master transcriptional regulator, the Pax6 homologue VAB-3, also participates to proper niche morphology. Our study opens the way to understand how the communication between a niche and its related stem cell evolves during development.

3.4. Material and Methods

3.4.1. Strains and alleles

Strains were maintained as described by Brenner (Brenner, 1974) and grown at 15°C. Mutant and/or transgenic animals of the indicated stage were put at the specified temperature for the indicated number of days before they were submitted to live imaging or immunofluorescence. We use the *qIS56[lag-2::GFP]* transcriptional reporter to visualize the DTC architecture in all conditions except in Figure 3.1B and C where *qIS57[lag-2p::GFP]* was used. The alleles and transgenes used in this study were: LGI: *gld-2(q497); gld-1(q485); hT2[qIs48]; ppw-1(pk1425)*; LGII: *qIs57[lag-2p::GFP]*; LG III: *glp-1(e2141); hT2[qIs48]; unc-32(e189) glp-1(q175); hT2 [bli-4(e937)]; glp-1(ar202); emb-30(tn377); lon-1(e185); par-3(it71); qC1 [dpy-19(e1259) glp-1(q339)]; unc-119(ed3); qIS57(lag-2::GFP)* LG IV: *fem-3(q20); ced-10(n1993)*; LG V: *qIS56(lag-2::GFP); rde-1(ne219); qIS56[lag-2::GFP]*; LG X: *vab-3(e648); vab-3(e1769)*; LG ?: *weIs21 [pJA138 (pie-1::mCherry::beta-tubulin::pie-1)]; qIs140[lag-2p::rde-1 + (pRF4) rol-6(su1006)]*. All mutants were generated by genetic crosses and genotypes were assessed visually by phenotypic scoring. In *gld-2(q497); gld-1(q485); glp-1(e2141)* triple mutants, the presence of *glp-1(e2141)* was confirmed by non-complementation assay.

3.4.2. Visualization and analysis of DTC and gonad morphology in live animals

Animals were paralyzed with 0.05% tetramisole (Sigma) in M9 and mounted on a glass slide with a 3% agarose pad sealed with VaLaP (1:1:1 Vaseline, Lanolin, and Paraffin). Image acquisition was done with a Nikon A1R point scanning confocal microscope using either a Plan-Apo 100X/1.4 numerical aperture (Figure 3.4B), a Plan-Apo 60X/1.4 (NA) oil-immersion objective (Figure 3.2A, B, and C only for WT, *apc-4(tn337)* and *glp-1(e2141)* mutants) or a 40X/1.25 NA water-immersion objective for remaining figures except Figure 3.4A. Laser power was set to visualize the thinnest extension and can hence vary between individuals. z sections separated by 0.75µm were taken from the top to the bottom of the distal

gonad using NIS-Element software (Nikon). For signal precision concern, all measurements were done by analyzing single z planes. The longest DTC processes length was calculated using NIS Nikon software by drawing a straight line, parallel to the distal gonad axis and joining the tip of the longest intact DTC processes to the most distal *lag-2::GFP* signal from the DTC. The same technique was used to calculate the second longest processe and the average lengths for these lines in all individuals were represented in histograms. Because of the complex DTC architecture, one processe that branched out from another one after a distance of 15 μ m from the DTC cell corpse was not considered as a new distinct processe and only the longest embranchment was measured. In most cases, mutants and controls were imaged the same day to avoid variability and new controls were used for each condition.

The number of processes is the number of extensions emanating at a distance of more than 8 microns from the DTC cell corpse. The % of joined processes was calculated by the ratio between the numbers of processes that contact each other over the total number of processes for one genetic background. Appreciation of the gonad length and pathfinding defects was possible by looking at mCherry::beta-tubulin transgene in all living specimens except in Figure 3.1B and C and in Figure 3.4B. In *vab-3(e648)* mutants, the gonad length was calculated by drawing a line that followed the germline curves from the distal end to the last oocyte.

3.4.3. Visualization of immunostainings and Phalloidin stainings in fixed animals

For alpha-tubulin and Phalloidin stainings, specimens were visualized using the procedure described for live animals. For GLP-1 stainings, specimens were visualized with a Zeiss LSM700 confocal microscope, using a Plan-Apo 63X/1.4 NA oil-immersion objective and laser power was adjust for optimum visualization. z sections separated by 1 μ m were taken from the top to the bottom of the distal gonad using the Zeiss ZEN software.

3.4.4. Immunofluorescence and Phalloidin staining

L4 animals were grown for 24hrs at 20°C. Gonads were dissected in M9 directly on the glass slide, fixed with 3% PFA/0.1 M K₂HPO₄ (pH 7.2) for 15 minutes at room temperature, permeabilized in 0.2% Triton X-100 in PBS (PBST) for 5 minutes and incubated with 10% goat serum for 30 minutes at room temperature. To visualize actin, Phalloidin coupled to Alexa-555 was added (1/100, Molecular probe) for 1 hour at room temperature and rinse 3 times for 10 minutes in PBST. Mountain medium containing DAPI was then added and specimens were visualized as described in section 3.4.3. To visualize tubulin, mouse-anti-alpha-tubulin antibody (1/200, Sigma) was incubated overnight at 4°C in a humid chamber. Slides were washed 3 times for 10 minutes in PBST and secondary goat-anti-mouse-Alexa546-coupled antibody (1/500, Invitrogen) was incubated 2 hours at room temperature. Slides were washed 3 times for 10 minutes in PBST and mountain medium containing DAPI was added. Specimens were visualized as described in section 3.4.3. GLP-1 immunostainings were performed as previously described (Crittenden and Kimble, 2009) with rabbit-anti-GLP-1 antibody (1/25 (Crittenden et al., 1994)), a gift from Judith Kimble. Mouse-anti-DA0-5 antibody (1/200, DSHB) was used as a control. Secondary goat-anti-rabbit-Alexa488-coupled and goat-anti-mouse-Alexa546-coupled antibodies (1/500, Invitrogen) or goat-anti-rabbit-Alexa546-coupled and goat-anti-mouse-Alexa488-coupled antibodies (1/500, Invitrogen) were incubated 2 hours at room temperature. Slides were washed 3 times for 10 minutes in PBST and mountain medium containing DAPI was added. Specimens were visualized as described in section 3.4.3. Native GFP fluorescence from *lag-2::GFP* expression was often preserved after PFA fixation.

3.4.5. RNAi treatment.

Protein depletion by RNAi feeding was performed as described previously (Kamath et al., 2003) using individual clones from Julie Ahringer's library. All clones were verified by sequencing. The empty vector L4440 was used as RNAi control. L1 animals were transferred to plates seeded with bacteria expressing dsRNA and the plate was incubated at 20°C for 4 days before animals were removed for visualization of the DTC morphology as describe in

section 3.4.2. Only few animals were put on each plate to prevent starvation. For co-depletion of the beta tubulin subunits 1 and 2, *tbb-1* and *and tbb-2* bacterial clones were grown separately and mixed in a 1:1 ratio before seeding.

3.5. Results and discussion

3.5.1. The DTC processes are microtubule-rich structures

The growth of DTC processes that occurs upon entry into the adult stage suggests that these structures may play a role in GPSC maintenance. To study the morphology of the DTC at all stages of development, we used a strain expressing the gene encoding GFP under control of the DTC-active *lag-2* promoter. We first sought to characterize the cytoskeletal nature of the DTC processes by fixing and staining extruded gonads with either rhodamine-coupled phalloidin, to visualize actin filaments, or anti-tubulin antibodies. We observed the presence of microtubules in the processes of 60% of the examined DTCs (n=15), whereas actin filaments were never visualized (n=4) (Figure 3.1A). This indicates that DTC processes are enriched in microtubules.

To test whether microtubules contribute the formation or maintenance of the DTC processes, we perturbed microtubule growth and organization in the DTC by depleting the tubulin chaperones CCT-1 and CCT-6 during larval development and measured the length of the two longest processes in adult animals (Lacroix et al., 2014; Lundin et al., 2008). Depletions were done in mutant animals that only allow RNAi-mediated silencing in their DTCs, thus precluding systemic effects of these treatments (see methods). We found that while the two longest DTC processes reach a distance of 72 μ m and 58 μ m from the cell body in control animals, the two longest DTC processes were drastically shorter after depletion of CCT-1 (20 μ m and 13 μ m) and CCT-6 (30 μ m and 22 μ m) (Figure 3.1B and 3.1C). Co-depletion of the two β -tubulin subunits TBB-1 and TBB-2 also resulted in a shortening of the DTC processes, although the effect was not as penetrant and mainly affected the shorter process (Figure 3.1B and 3.1C). Together, these results suggest that the growth and/or maintenance of DTC processes in the *C. elegans* germline niche depend on an intact microtubule cytoskeleton in the DTC. This contrasts with observations made in the *Drosophila* female germline, where membrane extensions growing from niche-like cap cell are actin-rich cytonemes (Rojas-Rios et al., 2012).

3.5.2. Formation but not maintenance of DTC processes is influenced by GSPC state

Previous studies showed that the growth rate of the DTC processes differs between individuals and that they can extend forward and backward, favoring a model in which processes are actively growing as opposed to a passive mechanism relying on the attachment to the underlying dividing germ cells (Wong et al., 2013). To test if the formation of DTC processes depends on GSPC mitosis, we monitored their length in animals mutant for *apc-4(tn377ts)*, encoding a subunit of the anaphase-promoting complex, and *glp-1(e2141ts)*, encoding the Notch receptor. At restrictive temperature, the GPSCs of both mutants stop proliferating and begin to differentiate (Cinquin et al., 2010; Korta et al., 2012; Priess et al., 1987). We found that DTC processes were either very short or failed to form when *apc-4* or *glp-1* mutant animals were allowed to grow at permissive temperature and shifted to restrictive temperature before DTC processes typically appear in control animals (Figure 3.2A and 3.2B). Shifting *apc-4* mutant animals to restrictive temperature when DTC processes had already formed did not cause a change in their length (Figure 3.2C). These results indicate that the formation of DTC processes, but not their maintenance, is stimulated by GSPC division and/or inhibited by germ cell differentiation.

To test if the extension of DTC processes was actively coupled to GSPC proliferation, we measured their length in *gld-2(q497); gld-1(q485)* double mutant animals (hereafter referred to as *gld-1/2* mutants), which cannot undergo germ cell differentiation and thus contain gonads filled with mitotic germ cells, a benign tumorous phenotype. We found that the DTC processes have similar lengths in *gld-1/2* homozygotes compared to heterozygote animals, whose germ cells proliferate and differentiate normally (Figure 3.2A and 3.2B). This indicates that the formation of DTC processes requires proliferating GPSCs but that their maintenance or their maximal extension is independent of germ cell divisions.

3.5.3. An intact GLP-1/Notch receptor is important but not essential for the formation of DTC processes

The presence of normal DTC processes in *gld-1/2* mutants but not in *glp-1(lf)* mutants prompted us to investigate a potential role for the GLP-1/Notch receptor itself in the formation of these structures. We first monitored DTC morphology in animals bearing the *glp-1(ar202ts)* gain-of-function allele, in which GSPCs typically overproliferate, as in *gld-1/2* mutants. At restrictive temperature, we found that *glp-1(gf)* mutants that formed proximal tumors and had an increased number of proliferating germ cells showed a delay in DTC processes growth, with the two longest processes reaching only 55-60% of control length 2 days after the L3 larval stage (Figure 3.3B). The longest process reached a normal length one day later, however the overall morphology of the niche was different from that of control animals: *glp-1(gf)* mutants had reduced number of DTC processes (less than 4 compared to more than 5 in control animals; Figure 3.3C) and these processes merged into a single extension in 70% of the animals, whereas this happened in only 6% of controls (Figure 3.3A and D). These defects were not observed in *gld-1/2* mutants, suggesting that they are not caused by GSPC overproliferation *per se* but rather rely on the proper expression and/or function of the GLP-1/Notch receptor. Accordingly, while an antibody against the extra-cellular domain of GLP-1/Notch (NECD) revealed the receptor localized at the lateral, basal and apical membranes of wild-type GSPCs, as previously described (n=6, Figure 3.4A) (Crittenden et al., 1994; Henderson et al., 1994), *glp-1(ar202gf)* mutants had GLP-1/Notch localized in puncta and patches at the surface of the gonad and inside germ cell nuclei, including the nucleolus (n=5, Figure 3.4A). It was surprising to find the NECD localized inside GSPCs because this domain is usually trans-endocytosed with the Delta ligand into the signal-sending cell (in this case the DTC) (Nichols et al., 2007). However, trans-endocytosis of the NECD occurs following interaction between the Delta ligand and the Notch receptor, and the *glp-1(ar202ts)* allele generates a GLP-1 receptor that is activated mostly independently of ligand binding, raising the possibility that the unbound NECD is inappropriately endocytosed into the signal receiving cell in these mutant animals.

To investigate the role of the GLP-1/Notch receptor in DTC morphology, we perturbed its activity using two loss-of-function alleles of *glp-1*, *q175* and *e2141ts*. *glp-1(q175)* is a

nonsense mutation that truncates the protein after the third extra-cellular EGF repeat and was reported to be null, with no protein detected in the mutant germlines (Kodoyianni et al., 1992) (Crittenden et al., 1994). *glp-1(e2141ts)* mutants however produce a protein containing two missense mutations in the intra-cellular domain, leaving the trans-membrane domain and the extra-cellular domain intact. Indeed, while *gld-2(q497); gld-1(q485); glp-1(q175)* mutants had no detectable levels of GLP-1/Notch in their germ cells (n=5), the germ cells of *gld-2(q497); gld-1(q485); glp-1(e2141ts)* mutants showed a mixed phenotype between a patchy GLP-1/Notch localization (n=2) or faint membrane staining (n=2) (Figure 3.4A). We found that, as compared to controls, the length of DTC processes was shorter in animals triple mutant for *gld-1/2* and either *glp-1* allele (Figure 3.3E). Importantly, these results also revealed that DTC processes are significantly shorter in triple mutants bearing the *glp-1(q175)* allele than the *glp-1(e2141ts)* allele, and are indistinguishable from DTC processes in *glp-1(e2141ts)* single mutant animals (Figure 3.3E). This different phenotypic outcome for both alleles was surprising since they both result in animals that equally fail to sustain GSPC proliferation (Kodoyianni et al., 1992). These results indicate that the GLP-1/Notch receptor controls the morphology of the stem cell niche independently of the fate and proliferation of GPSCs and further suggest that the presence of the receptor at the surface of germ cells, rather than its intracellular activity, is critical for proper DTC morphology.

Interestingly, while the GLP-1 receptor is important for proper niche morphology, some observations suggest that it is not essential or sufficient. Indeed, we sometimes saw that *glp-1(e2141ts)* single mutants shifted to restrictive temperature for 4 days after L1 stage could grow long DTC processes at adulthood. However, these processes looked different and were not stretched as in wild-type animals (Figure 3.4B).

3.5.4. Deficient DTC migration in males and in VAB-3 mutants correlates with changes in the niche morphology

The GLP-1/Notch receptor is expressed at the surface of germ cells from early larval stages and is essential for DTC morphology, however DTC processes only initiate their extension when animals enter adulthood. This further suggests that GLP-1/Notch is essential

but not sufficient for the extension of DTC processes and that another signal or event provides the cue for their growth. We set out to identify what are the events that trigger DTC process extension when animals reach the adult stage. The two main gonadal changes that occur upon entry into adulthood are the arrest of DTC migration and the beginning of oogenesis. Our finding that DTC processes are present in *gld-1/2* mutant animals, which fail to form gametes, indicates that oogenesis is dispensable for DTC process extension. Likewise, DTC processes formed and extended normally in animals depleted of CDC-42 or small RAC family GTPases, which often results in adults with mis-positioned DTCs, indicating that process formation occurs independently of the somatic cellular environment of the DTC (Figure 3.5A). We hence hypothesized that DTC process extension is prevented by DTC migration itself. The male germline provides a physiological context to first test this hypothesis, as the two male DTCs (mDTCs), located at the distal tip of the single gonad arm, do not migrate but regulate GSPC mitosis via Notch signaling, as is the case for hermaphrodite DTCs (hDTCs) (Kimble and White, 1981; Morgan et al., 2010). Interestingly, we found that mDTCs formed processes but that these were shorter (22 μ m for mDTC vs 66 μ m for hDTC) and fewer in numbers (1.3 for mDTC vs 3.6 for hDTC) than hDTCs (Figure 3.6 A and B). These differences are not a consequence of the type of gametes that are formed by the two sexes, as *fem-3(gf)* mutant hermaphrodites, which have a masculinized germline, showed no visible defect in niche morphology (Figure 3.5B). This indicates that the extension of DTC processes correlates with DTC migration.

We then asked whether DTCs extend processes when they fail to stop their movement and migrate for abnormally longer periods. We thus monitored DTC morphology in hermaphrodite animals mutant for *vab-3*, which encodes a homologue of the transcriptional regulator Pax6 that regulates DTC migration cell-autonomously by ensuring a proper balance between alpha-integrin receptors (Meighan and Schwarzbauer, 2007). In *vab-3(e1769)* mutants, both DTCs initially move to the correct position with proper dynamics, but then fail to stop their migration and pursue their movement throughout adulthood (Meighan and Schwarzbauer, 2007). We found that the DTC displayed an abnormal morphology and a decrease in the number of processes in all of these strong *vab-3* loss-of-function mutant animals (Figure 3.6C, D and E). Interestingly, measuring the length of the longest DTC

process in *vab-3(e1769)* mutants revealed that all animals fell in two phenotypic classes that were both significantly different from wild-type controls: one with short processes (20 μ m on average, close to the 22 μ m measured in mDTCs), and one with very long processes (92 μ m on average) (Figure 3.6F). These two phenotypes occur with similar frequency (Figure 3.6F) and the presence of a long or a short process did not correlate with the final position of the DTC (data not shown). We also monitored DTC morphology in animals mutant for *vab-3(e648)*, a weaker loss-of-function allele that results in a lower penetrance of the DTC migration defect (Meighan and Schwarzbauer, 2007). We found that while these animals had a normal DTC position and gonad length, the number and length of DTC processes were as in *vab-3(1769)* mutant animals (Figure 3.7A-C). These results suggest that VAB-3 can regulate niche morphology independently of its effect on DTC migration.

3.6. Conclusion

Taken together, our results indicate that *C. elegans* GSPCs modulate their niche morphology by expressing the Notch receptor GLP-1 at their cell membrane rather than by a mechanism that depends on their division or fate, as was previously suggested (Byrd et al., 2014). Our work supports a model in which the Notch receptor plays a dual role in the *C. elegans* germline: a canonical function in promoting GSPC self-renewal and a non-canonical role in the regulation of niche morphology. Non canonical roles for the Notch receptor have previously been proposed, including an evolutionary conserved role for Notch and Delta ligands as important adhesion molecules in *Drosophila* and mammalian cells (Akihiko et al., 2010; Akihiko et al., 2014). Understanding how the LAG-2/GLP-1 interaction promotes changes in DTC morphology in a timely manner may provide insight into this non-canonical activity.

3.7. Acknowledgements

We are grateful to the *Caenorhabditis* Genetics Center, and Judith Kimble (University of Wisconsin, Madison, US) for strains and GLP-1 antibody. We also thank members of the Labbé and Emery laboratory for helpful discussions and Christian Charbonneau of IRIC's Bio-imaging Facilities for technical help with image acquisition.

3.8. Figures

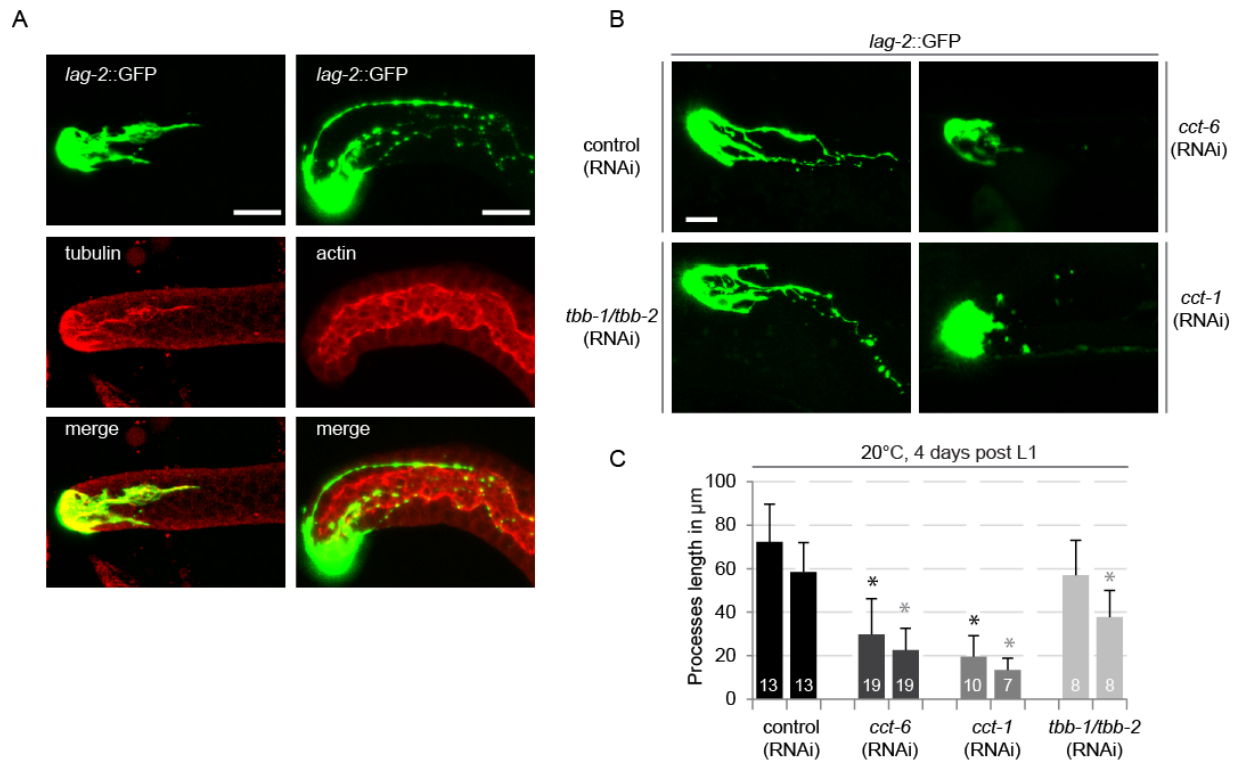


Figure 3.1 The DTC processes are microtubule-dependent structures.

(A) Maximal intensity projections of extruded gonads from adults stained with phalloidin, to visualize actin, or with alpha tubulin antibody to visualize microtubules. The DTC processes were observed by native *lag-2::GFP* fluorescence. In all panels, distal is to the left and scale bar is 10 μm . (B-C) Images and graph respectively showing the DTC morphology and reporting the length of the two longest processes in DTCs depleted of the tubulin chaperones *cct-6* or *cct-1* or co-depleted of the tubulin subunits *tbb-1* and *tbb-2*. Bacteria expressing the empty vector L4440 was used as a control. Worms were submitted to RNAi treatment from L1 for 4 days at 20°C before imaging (see Material and Method for details on analysis). In all panels, error bars represent standard deviation over the specified number of events (n), asterisks indicate statistical significance with control animals ($p \leq 0.05$, Student's t-test).

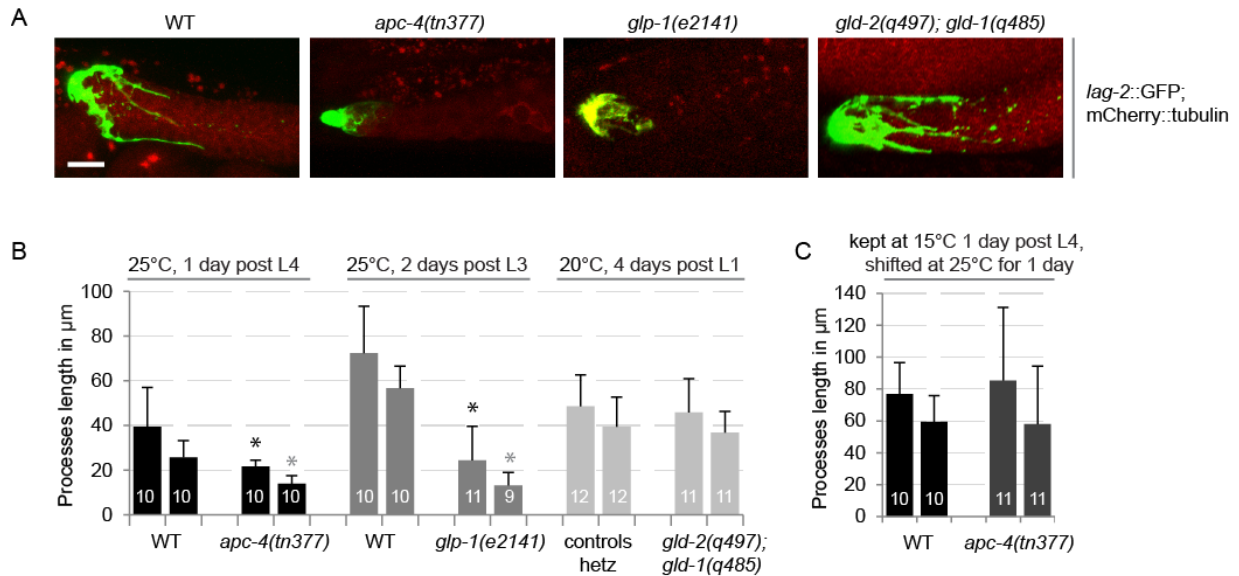
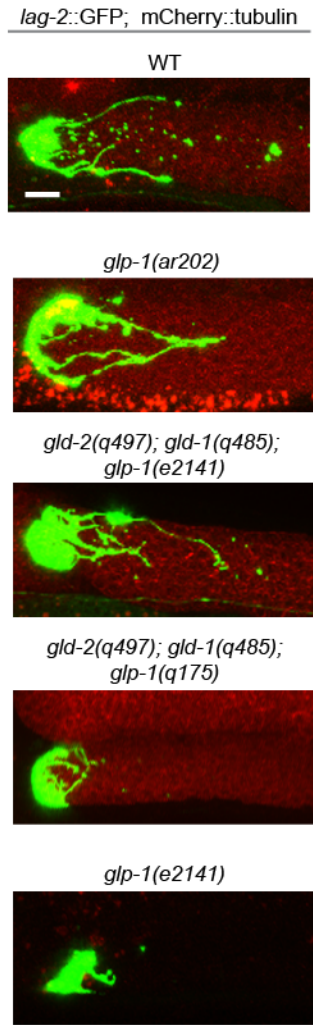


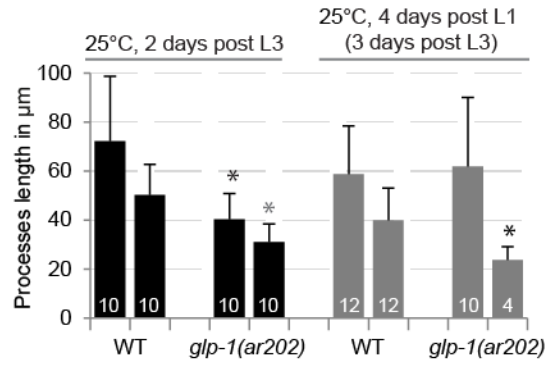
Figure 3.2 The DTC processes are stable structures which proper formation relies on GSPCs.

(A-B) Maximal intensity projections and graph showing respectively the DTC morphology (A) and reporting the length of the two longest DTC processes (B) in WT, *apc-4(tn377)*, *glp-1(e2141)*, or *gdl-2(q497); gdl-1(q485)* mutants that express *lag-2::GFP* and *mCherry::beta-tubulin*. The DTC processes were observed by *lag-2::GFP* fluorescence. (C) Graph reporting the length of the two longest processes in WT and *apc-4(tn377)* mutants shifted after DTC processes growth. In all panels, the number of days report the duration of the temperature shift after the indicated developmental stage. Distal is to the left and scale bar is 10µm. Error bars represent standard deviation over the specified number of events (n) and asterisks indicate statistical significance with control animals ($p \leq 0.05$, Student's t-test).

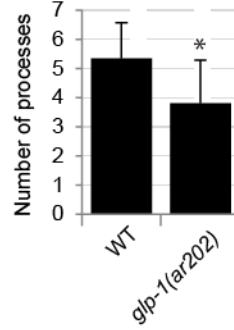
A



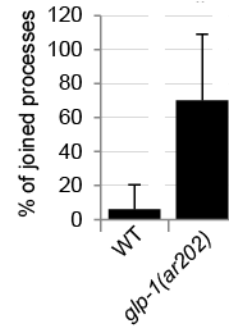
B



C



D



E

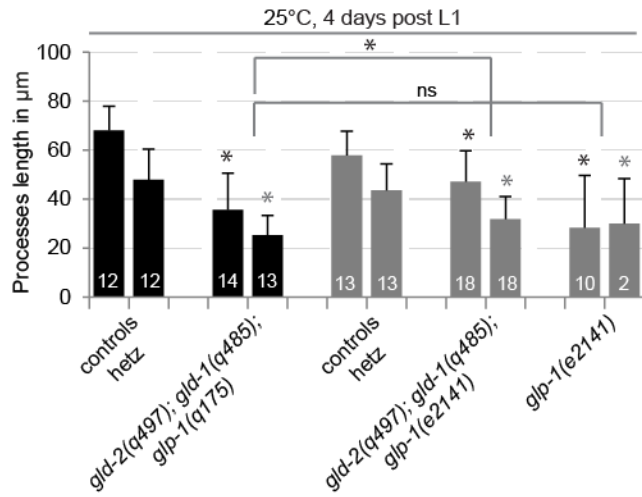


Figure 3.3 The DTC morphology is regulated by GLP-1 independently of germ cell state.

(A) Maximal intensity projections showing the DTC morphology in WT, and in different *glp-1* gain or loss of function mutants expressing *lag-2::GFP* and *mCherry::beta-tubulin*. The DTC processes were observed by *lag-2::GFP* fluorescence and normal, tumorous or empty germlines were observe by the *mCherry::beta-tubulin* transgene. In all panels, distal is to the left and scale bar is 10 μ m. (B) Graph reporting the length of the two longest processes in WT and in *glp-1(ar202)* gain of function mutants put at 25°C for the indicated number of days after the indicated developmental stage. (C-D) Graphs reporting the number of processes (C) and the % of joined processes (D) in WT and *glp-1(ar202)* mutants put at 25°C from L1 and for 4 days (see Material and Method for details). (E) Graph reporting the length of the two longest processes in WT and in *glp-1* loss of function mutants put at 25°C from L1 and for 4 days. In all panels, error bars represent standard deviation over the specified number of events (n), asterisks indicate statistical significance with control animals ($p \leq 0.05$, Student's t-test).

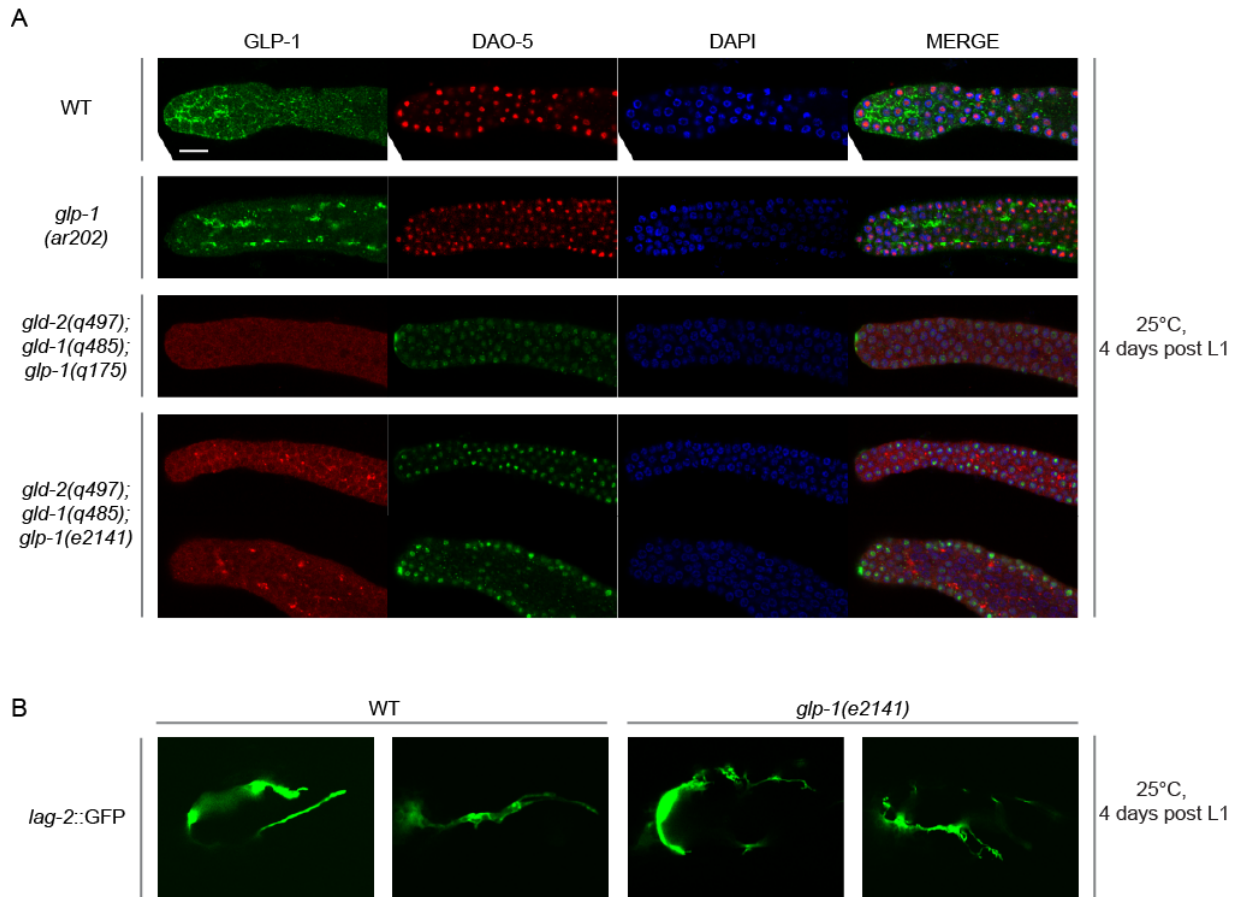


Figure 3.4 GLP-1 localization defects correlate with niche morphology defects in *glp-1* mutants.

(A) Images corresponding to single confocal z section of extruded gonad from WT or *glp-1* gain or loss of function mutants stained with GLP-1 antibody (first column), DAO-5 antibody (second column, control antibody that stains the nucleolus) and DAPI (third column). Remaining native *lag-2::GFP* fluorescence can be detected in the DTC. In all panels, distal is to the left and scale bar is 10 μ m. (B) Images corresponding to single confocal z section showing the DTC processes morphology in WT and rare *glp-1(e2141)* animals that grow processes at 25°C, 4 days post L1. DTC processes were observed by *lag-2::GFP* fluorescence.

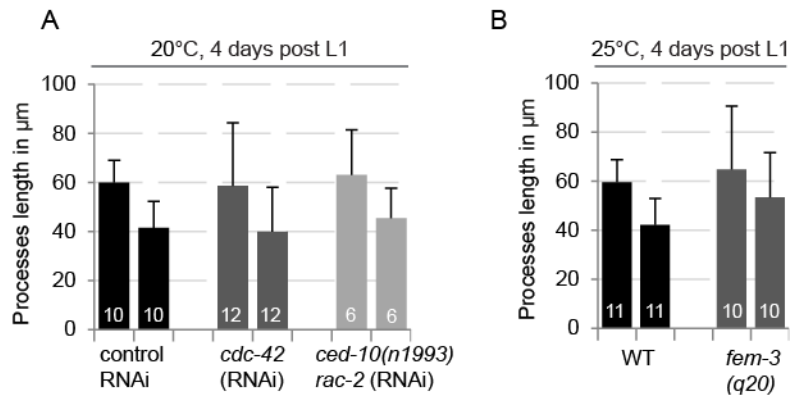


Figure 3.5 (Figure S1) The DTC processes growth is independent of the germ cells sexual identity or the DTC position in the worm.

(A and B) Graphs reporting the length of the two longest processes in conditions that either affect DTC positioning (A), or transform the sexual identity of the future gametes into male fate (B). L1 larvae were put at the desired temperature for the indicated number of days. DTC pathfinding defects or absence of oocytes were visualized using the mCherry::beta-tubulin transgene. The DTC processes were observed by *lag-2::GFP* fluorescence. Error bars represent standard deviation over the specified number of events (n), asterisks indicate statistical significance with control animals ($p \leq 0.05$, Student's t-test).

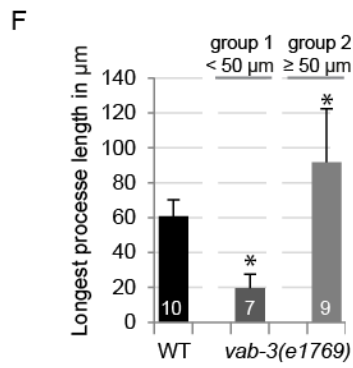
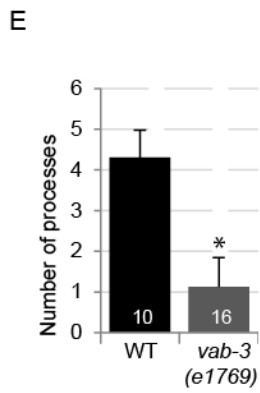
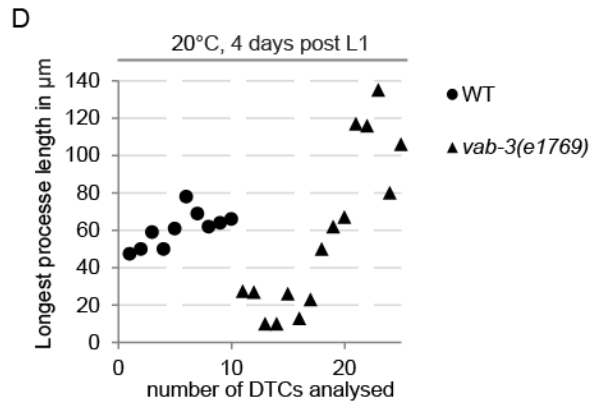
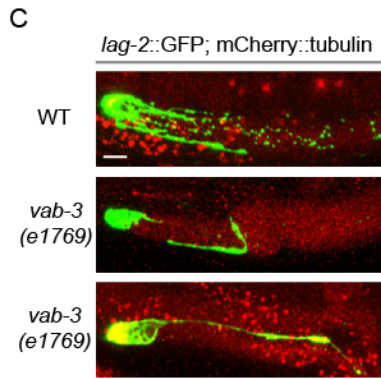
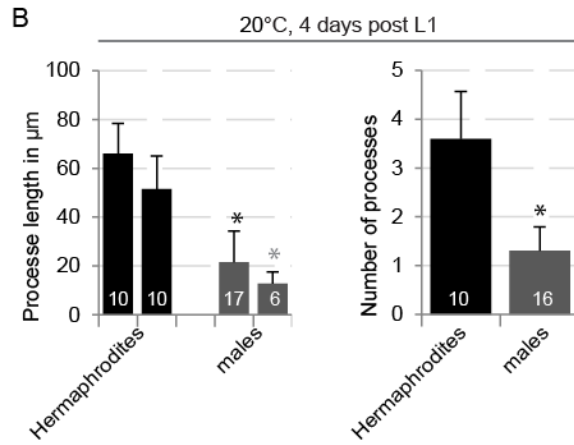
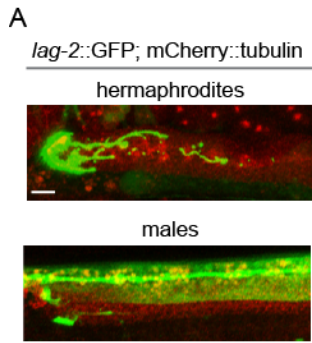


Figure 3.6 The DTC migration could prevent the processes growth.

(A-B) Maximal intensity projections and graphs showing respectively the DTC morphology (A) and reporting the length of the two longest processes (B, left graph) and the number of DTC processes (B, right graph) in males and hermaphrodites, 4 days post L1 at 20°C (see Material and Method for details). DTC processes were observed by *lag-2::GFP* fluorescence. In all panels, distal is to the left and scale bar is 10µm. Error bars represent standard deviation over the specified number of events (n), asterisks indicate statistical significance with control animals ($p \leq 0.05$, Student's t-test). (C-G) Maximal intensity projections and graph respectively showing the DTC morphology (C) and reporting the length of the longest processes (D-F) and the number of DTC processes (E) in WT and in continuously migrating DTCs from *vab-3(e1769)* mutants (Meighan and Schwarzbauer, 2007).

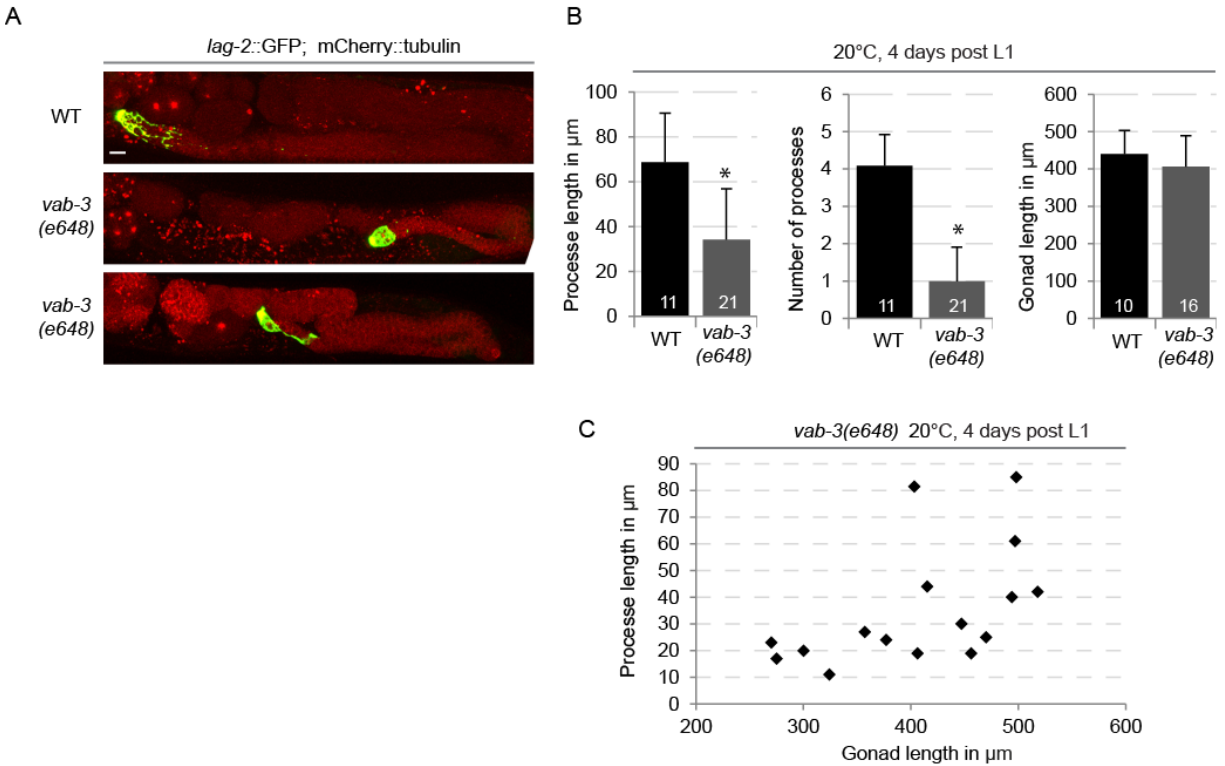


Figure 3.7 VAB-3 could regulate the DTC maturation independently of its control on the DTC migration.

(A-B) Maximal intensity projections and graphs showing respectively the DTC morphology (A) and reporting the length of the two longest processes (B, left graph), the number of DTC processes (B, middle graph) and the gonad length (B, right graph) in WT and *vab-3(e648)* mutants 4 days post L1 at 20°C. The values for *vab-3(e648)* longest processes are represented in function of gonad length in graph C. Gonad length was visualized using the mCherry::beta-tubulin transgene (see Material and Method for details). The DTC processes were observed by *lag-2::GFP* fluorescence. In all panels, distal is to the left and scale bar is 10 μm . Error bars represent standard deviation over the specified number of events (n), asterisks indicate statistical significance with control animals ($p \leq 0.05$, Student's t-test).

CHAPITRE 4

4. Discussion

4.1. Des régulateurs communs couplent le cycle cellulaire à la polarité durant la division asymétrique

Le chapitre 2 de cette thèse montre que deux cyclines de type B, CYB-2.1 et CYB-2.2, peuvent réguler la stabilité de la protéine PAR-6, probablement d'une façon dépendante de la culline CUL-2, précédemment impliquée dans la dégradation de PAR-6 (Pacquelet et al., 2008; Rabilotta et al., 2015). Mes données montrent pour la première fois chez *C. elegans* que deux régulateurs actifs dans le cycle cellulaire ont un effet dans la division asymétrique de l'embryon sans que leur perte ne mène à une dérégulation substantielle du cycle cellulaire. En effet, des défauts dans la progression méiotique et mitotique sont souvent associés à une perte de polarité embryonnaire. Le mécanisme d'action et la cible directe de ces cyclines n'ont toutefois pas été caractérisés, mais des hypothèses relatives à ces questions ont été émises dans la section 2.6 et seront aussi développées dans les paragraphes ci-dessous.

4.1.1. CYB-2.1/2/CDK-1 forme-t-il un complexe régulant spécifiquement la polarité chez l'embryon?

À la lumière des résultats présentés au chapitre 2, il demeure incertain si CYB-2.1/2 forme un complexe avec CDK-1 et si ce complexe a un rôle spécifique dans la régulation de la polarité chez l'embryon de *C. elegans*. La réponse à la première question pourrait être adressée par GST pull down, en regardant si CDK-1 provenant d'extraits d'embryons sauvages interagit avec GST::CYB-2.1/2. La même expérience chez les mutants *cdk-1(ne2257)* permettrait de quantifier plus précisément la contribution de CYB-2.1/2 au sein du complexe CYB-2.1/2/CDK-1 pour son rôle dans la polarité. Il serait ainsi possible de déterminer si CYB-2.1 et CYB-2.2 confèrent la spécificité de substrat à leur kinase associée pour contrôler la division asymétrique, en regardant si l'interaction potentielle entre ces cyclines et CDK-1 est perdue chez les mutants *cdk-1(ne2257)*. En accord avec cette possibilité, les mutants *cdk-1(ne2257)* suppriment les défauts de polarité des mutants *par-2(it5ts)* et présentent une diminution des niveaux de PAR-6 similairement aux mutants *cyb-2.2(0); cyb-2.1(0)*. L'étude de Shirayama et ses collègues, portant sur la régulation de la

dégradation des protéines OMA par des régulateurs du cycle cellulaire, laisse cependant envisager un autre mécanisme. En effet, alors que l'allèle *cdk-1(ne2257)* ou la déplétion de la cycline CYB-3 interfèrent similairement avec la dégradation d'OMA-1, CYB-3 peut quand même interagir avec CDK-1 chez les mutants *cdk-1(ne2257)*. Ces résultats suggèrent donc que le niveau d'activité de CDK-1, plutôt que la spécificité de substrat conférée par la cycline, est important pour la dégradation d'OMA-1 (Shirayama et al., 2006). En accord avec l'hypothèse qu'une activité seuil de CDK-1 est spécifiquement requise pour chacune de ses fonctions dans le cycle cellulaire, la transition ovocyte-embryon et la polarité cellulaire, les résultats présentés à la Figure 2.4 montrent que le triple mutant *cyb-2.2(0); cdk-1(ts); cyb-2.1(0)* ne supprime pas la létalité et les défauts de polarité chez les embryons déplétés de *par-2*. La régulation de polarité chez ces mutants est donc probablement sensible au niveau d'activité de CDK-1, plutôt qu'à la présence de CYB-2.1/2 au sein du complexe CYB-2.1/2/CDK-1. Cette hypothèse peut sembler contradictoire avec le résultat montrant que CDK-1 est actif et phosphoryle l'histone H1 chez les mutants *cdk-1(ne2257)* (Shirayama et al., 2006). Cependant, il est probable que son activité envers d'autres substrats soit partiellement compromise puisque de légères variations dans le cycle cellulaire peuvent être observées chez ces mutants, même à température semi-restrictive (Figure 2.7A).

4.1.2. Le mécanisme de régulation des niveaux de PAR-6 par CYB-2.1/2/CDK-1 : des études chez *C. elegans* et la *Drosophile* ouvrent des pistes de compréhension

Outre les points discutés dans la section 2.6 du chapitre 2, quelques hypothèses sur le mécanisme d'action de CYB-2.1 et CYB-2.2 peuvent être formulées sur la base de parallèles existant entre la régulation de la division asymétrique par des régulateurs mitotiques chez *C. elegans* et dans d'autres espèces.

Par exemple, chez la drosophile, Lgl prévient l'invasion du complexe PAR apical au pôle basal en compétitionnant avec PAR-3 pour sa liaison à PAR-6. Aurora A régule cette interaction et initie la formation d'un complexe Par6/Bazooka/aPKC en phosphorylant PAR-6. Puisque Cdk1 active Aurora A en phosphorylant son partenaire de liaison Bora chez la

Drosophile, on peut imaginer que la perte de Cdk1 puisse indirectement affecter la localisation des protéines PAR dans ce modèle (Wirtz-Peitz et al., 2008). D'ailleurs, une diminution de l'activité de Cdk1 ou des niveaux des cyclines B entraîne une perte de polarité chez le neuroblaste (Tio et al., 2001).

Lgl a aussi une fonction dans la division asymétrique chez l'embryon de *C. elegans* puisque son homologue, LGL-1, localisé au pôle postérieur du zygote, agit de façon redondante avec PAR-2 dans le maintien de la polarité (Beatty et al., 2010; Hoege et al., 2010). Cependant, le mécanisme d'action de LGL-1 est probablement différent chez *C. elegans* puisqu'il agit en régulant les niveaux de PAR-6 plutôt qu'en modulant sa localisation corticale (Beatty et al., 2013). En effet, la perte de *lgl-1* entraîne une augmentation des niveaux de PAR-6 et, bien qu'elle ne génère pas en soi une perte de polarité, elle augmente les défauts de polarité des mutants *par-2(it5ts)*. À l'inverse, la surexpression de LGL-1 supprime ces défauts. Ces données sont d'autant plus intéressantes que la perte de *cyb-2.1* et *cyb-2.2* engendre des effets contraires à celle de *lgl-1* lors de la division asymétrique de l'embryon de *C. elegans* (Figure 2.3 et 2.9B). Bien que CDK-1 active aussi SPAT-1, homologue de Bora chez *C. elegans*, ce dernier est un activateur de PLK-1 plutôt que de AIR-1 (homologue d'Aurora A) (Tavernier et al., 2015). Or la déplétion de *plk-1* et *spat-1*, mais pas celle de *air-1*, supprime aussi la létalité des mutants *par-2(it5ts)*, suggérant de prime abord qu'une cascade d'activation entre les protéines SPAT-1, PLK-1 et CYB-2.1/2/CDK-1 pourraient permettre de réguler la polarité via LGL-1. Cependant, plusieurs évidences suggèrent que CYB-2.1/2/CDK-1 agit indépendamment de ces deux régulateurs mitotiques. En effet, contrairement aux embryons déplétés de *lgl* ou mutants pour *cyb-2.1/2*, les embryons provenant de vers traités avec *spat-1(RNAi)* ou *plk-1(RNAi)* présentent des défauts importants dans la localisation des protéines PAR. Ceux-ci incluent soit une localisation de PAR-2 au pôle antérieur et postérieur avec PAR-6 occupant une bande centrale ou encore une frontière entre les domaines PAR antérieur et postérieur qui n'est pas perpendiculaire à l'axe de polarité. Ces embryons ont aussi des défauts importants dans la progression de leurs cycles méiotique (tel que déduit par la présence de plusieurs pronoyaux femelles) (Noatynska et al., 2010). En accord avec le modèle d'établissement de la polarité par les microtubules décrit par Motegi et ses collègues (Motegi et al., 2011), la formation d'un domaine ectopique de PAR-2 au pôle antérieur pourrait donc

s'expliquer par un contact prolongé du fuseau méiotique avec le cortex lors d'un éventuel délai dans la progression méiotique. Le deuxième défaut de polarité mentionné pourrait être la conséquence de l'initiation de la polarité corticale au cortex latéral si le centrosome paternel ne parvient pas à se repositionnement au cortex postérieur de l'embryon après la fertilisation. Le mécanisme spécifique de ce repositionnement est inconnu, mais impliquerait une réorganisation locale de l'acto-myosine (Goldstein and Hird, 1996). En résumé, certains défauts de polarité engendrés par la perte de *plk-1* et *spat-1* ne sont pas observés chez les mutants *cyb-2*, suggérant que ces régulateurs mitotiques ne fonctionnent pas ensemble dans la polarité. Une nuance peut toutefois être apportée puisque la perte de localisation des protéines PAR chez les embryons déplétés de *spat-1* et *plk-1* pourrait être en partie non spécifique et s'expliquer par le rôle essentiel de ces protéines dans le cycle cellulaire.

Pour déterminer s'il existe une régulation du complexe PAR antérieur par LGL-1 en aval des régulateurs mitotiques il serait donc plus approprié de déterminer la relation épistatique entre CYB-2.1/2 et LGL, puisque leur déplétion ou leur perte n'engendre pas de défauts majeurs dans le cycle cellulaire. Par exemple, si CYB-2.1/2 et LGL-1 agissent ensemble dans la polarité, on pourrait ne pas voir un effet additif sur la suppression de létalité chez les triples mutants *cyb-2.2(0); par-2(ts); cyb-2.1(0)* en sur-exprimant LGL-1. Suivant la même logique, la létalité embryonnaire associée à la perte de *par-2* devrait être relativement équivalente chez les mutants *par-2* déplétés de *lgl-1* par rapport aux mutants *cyb-2.2(0); par-2(ts); cyb-2.1(0)* déplétés de *lgl-1* si CYB-2.1/2 agit strictement via LGL-1. En accord avec l'hypothèse que CYB-2.1/2/CDK-1 puisse réguler LGL-1, cette protéine possède un site consensus de phosphorylation par CDK-1 et plusieurs sites minimaux. Éventuellement, s'il s'avère que LGL-1 est épistatique à CYB-2.1/2 pour son rôle dans la division asymétrique, l'expression d'une forme mutante de LGL pour ces sites pourra être utilisée dans des essais de suppression chez les mutants *par-2(ts)*. Par exemple, on ne s'attendrait pas à supprimer la létalité des mutants *par-2(ts)* en exprimant une forme phosphomimétique de LGL-1 pour ces sites, si CYB-2/CDK-1 régule directement LGL-1 par phosphorylation pour son rôle dans la polarité.

Enfin, l'idée que CDK-1 agisse uniquement via une régulation des niveaux de PAR-6 peut aussi être nuancée. En effet, CDK-1 a probablement de multiples cibles jouant des rôles

divers dans la polarité. Par exemple, CDK-1 est important dans la régulation du positionnement du fuseau mitotique en anaphase chez l'embryon (McCarthy Campbell et al., 2009). J'ai aussi observé une perte de la localisation corticale de PAR-3 endogène dans près de la moitié des embryons provenant de mutants *cdk-1(ne2257)* et chez 20% des embryons provenant de mutants *cyb-2*, mais pas chez les embryons sauvages (résultats non montrés). Même si on ne peut exclure un problème de détection hasardeux de l'anticorps PAR-3, ceci pourrait suggérer qu'une diminution de l'activité de CDK-1 entraîne une diminution de l'association corticale de PAR-3. Fait intéressant, la déplétion de la protéine CDC-37, une chaperonne impliquée dans l'activation de plusieurs kinases chez d'autres organismes, incluant Cdk4 et Lkb1, semble aussi découpler la localisation de PAR-6 et de PAR-3 chez l'embryon de *C. elegans* (Beers and Kemphues, 2006). De plus, CDC-37 est important pour la localisation transitoire de PAR-6 au noyau durant le bris de l'enveloppe nucléaire (Beers and Kemphues, 2006; Cuenca et al., 2003). La raison de cette localisation demeure inconnu mais laisse entrevoir la possibilité que PAR-6 y soit phosphorylé par CDK-1 en phase M. Puisque PAR-6 pourrait avoir des interactions différentes avec PAR-3 et CDC-42 en phase d'établissement de la polarité (durant l'interphase et la prophase) ou en phase de maintien de la polarité (durant le reste de la phase M) (Beers and Kemphues, 2006), il est possible de son entrée au noyau constitue un évènement important pour modifier ses interactions ultérieures avec certaines protéines de la polarité. Ainsi, il semble concevable que CYB-2.1/2/CDK-1 puisse agir à divers niveaux, d'une part en stabilisant PAR-6 et peut-être aussi en régulant l'association corticale de PAR-3.

De façon plus générale, pour faire avancer l'ensemble de ces questions, l'identification de façon non biaisée des cibles potentielles du complexe CYB-2.1/2/CDK-1 *in vivo* serait utile. Puisque l'interaction entre une kinase et ses substrats est transitoire, une technique de co-immunprécipitation n'est probablement pas un choix judicieux. La technique *BioID*, pourrait être plus prometteuse (Roux et al., 2012). En fusionnant l'enzyme BirA, qui biotinylyse toutes les protéines venant à son contact, avec CDK-1, on pourrait ainsi identifier les cibles de la kinase chez l'embryon. Pour ce faire, il faudrait générer des lignées transgéniques exprimant *CDK1::BirA*, où CDK-1 serait soit la protéine sauvage ou la protéine portant la substitution I173F (encodée par l'allèle *cdk-1(ne2257)*). L'expression de ces transgènes pourrait être faite

dans un contexte WT et chez les mutants *cyb-2.1/2*. La capture des protéines biotinyllées se ferait ensuite par l'utilisation de billes conjuguées à la streptavidine et leur identification par spectrométrie de masse. Les cibles potentielles de CDK-1 ainsi identifiées pourraient être classées en deux catégories, soit celles dont l'abondance varie différemment chez les vers sauvages exprimant CDK-1(I173F)::BirA ainsi que chez les vers *cyb-2.1/2* mutants exprimant CDK-1::BirA comparativement aux autres conditions. Sachant que les mutants *cyb-2.1/2* ou *cdk-1(ne2257)* suppriment similairement les défauts de polarité associés à la perte de *par-2*, ces cibles seraient de bons candidats à analyser pour leur rôle potentiel dans la division asymétrique en aval de CYB-2.1/2/CDK-1.

4.1.3. Limites expérimentales

Certaines techniques utilisées dans l'étude présentée au chapitre 2 sont limitantes pour répondre aux questions soulevées dans la discussion. Par exemple, l'utilisation d'anticorps pour déterminer la localisation des protéines PAR chez les mutants *cyb-2.1/2* ou *cdk-1* permet certes d'observer les protéines endogènes, mais n'offre pas de vision dynamique de leur localisation au cours des différentes phases de la polarisation et du cycle cellulaire. Or cette localisation dynamique peut varier à des moments précis dans le cycle cellulaire chez certains mutants.

De plus, selon la spécificité de l'anticorps, les immunofluorescences peuvent être difficilement comparables entre elles lorsque l'on veut déterminer un changement dans les niveaux d'une protéine d'intérêt, comme c'est le cas ici pour PAR-6. La technique du western blot utilisée pour analyser les niveaux de PAR-6 chez les mutants *cyb-2.1/2* et *cdk-1* est une alternative qui présente toutefois d'autres limites. Par exemple, elle ne permet pas de déterminer les niveaux protéiques de PAR-6 uniquement chez les zygotes unicellulaires puisque les embryons sont à des stades développementaux différents dans les extraits embryonnaires. Bien que cette question puisse théoriquement être adressée dans des lignées transgéniques exprimant par exemple PAR-6::GFP, la sur-expression même de PAR-6 pourrait masquer la diminution des niveaux de la protéine, de telle sorte qu'elle ne soit plus visible en utilisant cette technique. J'ai moi-même remarqué une antériorisation subtile de

PAR-6::GFP chez une lignée transgénique mutante pour *cyb-2.1/2*, suggérant possiblement une diminution des niveaux de cette protéine, alors qu'une autre lignée transgénique ne montrait pas ce phénotype. La génération de lignées exprimant les différentes protéines PAR sous leur promoteur endogène, par la technique d'édition du génome CRISPR (*clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats*) serait donc utile pour pallier à ces limites expérimentales.

4.2. La communication niche/cellules souches est bidirectionnelle chez *C. elegans*

La communication niche/cellules souches permet de maintenir l'homéostasie au sein du bassin de cellules souches adultes et de répondre à une demande croissante dans le nombre de cellules souches lors du développement et du processus de réparation cellulaire. Au sein de plusieurs organismes, cette communication se traduit par une prépondérance de la division asymétrique lors du maintien des cellules souches et une augmentation des divisions symétrique lors des phases d'expansion du bassin (Morrison and Kimble, 2006). Chez *C. elegans*, la présence de ces deux modes de divisions n'a jamais été démontrée alors que le modèle offre l'avantage unique de suivre un nombre important de divisions de cellules souches *in vivo*, par microscopie en temps réel. Le fondement d'un tel vide dans l'amas de connaissances se rapportant à la régulation des cellules souches de la lignée germinale provient probablement du comportement morphologique de la niche chez cet organisme. Les changements morphologiques de la DTC ont récemment été corrélés à la présence des CSPG, mais aucune donnée n'a permis d'entrevoir une piste de compréhension dans le mécanisme de leur formation. Le chapitre 3 apporte de nouvelles informations pour répondre à cette problématique mais laisse aussi plusieurs questions en suspens qui seront discutées dans cette section.

4.2.1. Repenser la division asymétrique dans la lignée germinale de *C. elegans*

Les ligands DSL exprimés par la DTC sont de nature transmembranaire (Fitzgerald and Greenwald, 1995; Henderson et al., 1997; Henderson et al., 1994), suggérant qu'un contact cellule-cellule est requis pour l'activation de Notch dans la lignée germinale. Pourtant, jusqu'à ce jour, aucune étude ne s'est intéressée aux différences dans le comportement des CSPG contactant une extension de la DTC, donc recevant probablement un signal Notch plus élevé, par rapport aux CSPG n'ayant pas de contact direct avec la niche. Par analogie avec le modèle de la *Drosophila*, il est tentant de spéculer qu'une CSPG contactant la DTC (ou l'une de ses

extensions) oriente son axe de division par rapport à celle-ci, de telle sorte qu'une seule de ses cellules filles garde contact avec la niche alors que l'autre s'en éloigne. Cependant, en s'éloignant, cette cellule fille se rapprochera peut-être aléatoirement une autre extension. Est-ce alors une division symétrique ou asymétrique? Une diminution de la complexité de la morphologie de la niche chez des mutants qui n'empêchent pas les divisions des CSPG pourrait être utile pour analyser l'importance potentielle d'un mode de division régulé dans ce système. Par exemple, les mutants *vab-3* produisent des gamètes et ont une DTC présentant souvent une extension unique. Ces attributs en font des candidats intéressants pour l'analyse de l'orientation des divisions chez les CSPG contactant l'extension unique. Chez ces mutants, le mode de division pourrait être comparé dans des contextes différents. Ainsi, en situation normale chez l'adulte, lors du maintien du bassin de CSPG, on s'attendrait à des divisions majoritairement asymétriques alors que dans le contexte d'une demande élevée en cellules souches, par exemple suite à l'ablation de quelques CSPGs de la zone mitotique, on s'attendrait à des divisions majoritairement symétriques. Bien sûr, il faut prendre en considération le contexte génétique des mutants *vab-3*. Ce contexte pourrait être problématique puisque chez la souris, la perte de l'homologue de *vab-3*, Pax-6, affecte l'orientation des divisions de progéniteurs neuronaux au sein du cortex cérébral (Asami et al., 2011). Dans le cadre de l'analyse du mode de division des CSPG au sein de la lignée germinale de *C. elegans*, les mutants *vab-3* doivent donc être utilisés avec des contrôles appropriés. Par exemple, la déplétion de *vab-3* dans la gonade somatique, mais pas dans la lignée germinale, pourrait être effectuée par l'utilisation d'ARNi ciblant *vab-3* chez des vers incapables pour cette déplétion dans les cellules germinales. Cette condition permettrait d'une part d'assurer que la perte de *vab-3* ne perturbe pas l'orientation des divisions des CSPG de façon autonome à ces cellules et d'autre part confirmerait le rôle de VAB-3 dans la maturation morphologique de la niche, indépendamment des CSPG. Cette dernière information est pertinente puisque mes résultats montrent l'existence d'une communication bidirectionnelle entre les cellules souches et leur niche, n'écartant pas l'éventualité que la régulation de la niche par VAB-3 soit médiée par son effet potentiel sur les CSPG. Par contre, l'expression de VAB-3 est observée au sein de la DTC sous son promoteur endogène, laissant

envisager un effet autonome à la cellule pour la régulation morphologique de la niche (Meighan and Schwarzbauer, 2007).

Toujours dans le but d'adresser l'existence potentielle d'une régulation du mode de division des CSPG chez *C. elegans*, il serait intéressant de regarder si l'orientation de ces divisions diffère lorsque les régulateurs des protéines G, *gpr-1* et *gpr-2*, sont déplétés. En plus d'être essentiels au positionnement asymétrique du fuseau mitotique chez l'embryon, leur homologue chez les mammifères, LGN, régule le positionnement du fuseau mitotique pour assurer la division asymétrique des cellules neuroépithéliales du système nerveux central. Contrairement à ce qui est observé dans les lignées germinales de la Drosophile, le mode de division symétrique ou asymétrique ne nécessite pas une orientation strictement parallèle ou verticale du fuseau mitotique relativement à la surface du neuroépithélium chez ces cellules. En effet, la surface apicale héritée par la cellule gardant l'identité de cellule souche est si petite qu'un faible changement dans l'orientation est suffisant pour transformer une division symétrique en division asymétrique (Konno et al., 2008). Au sein de la lignée germinale de *C. elegans*, la comparaison de l'orientation du fuseau mitotique chez les CSPG provenant de vers sauvages ou déplétés de *gpr-1/2* pourrait montrer des différences suggérant que l'orientation du fuseau mitotique fait l'objet d'une régulation. Dans ce contexte, il serait intéressant de comparer les vers aux stades larvaires à ceux au stade adulte et aussi de faire cette expérience chez les mutants *vab-3*.

Enfin, on peut se demander si l'évolution spatio-temporelle de l'ensemble DTC/extensions corrèle bien avec son rôle potentiel dans la régulation du comportement des CSPG. Une étude de Crittenden et ses collègues a montré que la longueur des extensions de la DTC ne dicte probablement pas la longueur de la zone mitotique, notamment chez les adultes plus âgés (72hrs après le stade L4) chez qui les extensions atteignent une longueur maximale supérieure à celle de la zone mitotique (Crittenden et al., 2006). Une nuance doit toutefois être apportée quant au calcul même de l'étendue de la zone mitotique. Celle-ci a été définie comme s'étalant jusqu'à la première rangée de cellules ayant au moins une cellule en prophase méiotique qui définit alors le début de la zone de transition (Crittenden et al., 2006). Ainsi, chez l'adulte, la zone de transition comprend aussi des cellules mitotiques (Hansen et al.,

2004a), n'excluant pas la possibilité que les extensions participent au maintien de l'identité de cellule souche. Il est aussi possible que la perte de corrélation entre la zone recouverte par les extensions et la zone mitotique puisse s'expliquer par un déclin du signal Notch provenant des extensions chez les vers plus âgés. En effet, le nombre de cellules souches diminue avec l'âge chez *C. elegans*. Chez la drosophile, cette diminution est aussi observée et est causée par une diminution du signal de la niche ainsi que par une perte d'expression des E-cadhérines qui attachent les CSG à leur niche (Pan et al., 2007).

4.2.2. Comment GLP-1 participe-t-il à la formation des extensions au stade adulte?

4.2.2.1. L'expression de GLP-1 par les CSPG, plutôt que leur destin cellulaire, est importante pour la maturation de la niche

Récemment, Byrd et ses collègues ont trouvé que les CSPG peuvent influencer la morphologie de la DTC, mais le mécanisme de cette régulation demeure inconnu (Byrd et al., 2014). Similairement, j'ai trouvé que les cellules souches germinales peuvent modifier l'architecture de leur niche, apportant une démonstration indépendante que la communication niche-cellule souche est bidirectionnelle au sein de la lignée germinale de *C. elegans*. Cependant, contrairement aux conclusions de Byrd et ses collègues, mes données suggèrent que l'expression d'un récepteur GLP-1 intact, plutôt que l'identité même des CSPG, est importante pour la maturation de la niche. Premièrement, j'ai trouvé que les mutants *glp-1(ar202)* gain-de-fonction, chez lesquels l'identité de cellule souche est préservée grâce à la formation de tumeurs germinales, présentent une morphologie anormale de leur DTC (Figure 3.3A-D). Celle-ci n'est probablement pas causée par l'augmentation du nombre de cellules mitotiques ou l'absence de formation des gamètes puisque les doubles mutants *gld-2(q497); gld-1(q485)* présentent eux aussi des tumeurs germinales, mais ont une morphologie normale de leur niche (Figure 3.2A-B). Deuxièmement, les mutants *gld-2(q497); gld-1(q485); glp-1(q175)* montrent une diminution de la longueur des extensions de la DTC même s'ils maintiennent l'identité de cellule souche chez leurs cellules germinales, conformément au rôle de *gld-1* et *gld-2* en aval

de la voie Notch (Figure 3.3E). Or, l'argument principal de Byrd et ses collègues en faveur d'un modèle de maturation de la niche dépendant du destin des cellules germinales provenait de l'observation que la DTC possède une morphologie normale chez les mutants *gld-3*; *nos-3*; *glp-1(q224ts)*. Chez ces mutants, le récepteur GLP-1 est rendu inactif à cause d'une substitution dans une des répétitions ankyrines du domaine intracellulaire (NICD), mais l'identité de cellule souche est conservée chez toutes les cellules germinales, conformément au rôle de *gld-3* et *nos-3* en aval de la voie Notch (Austin and Kimble, 1987). Comment peut-on alors interpréter ces résultats apparemment contradictoires? La différence ne provient probablement pas du contexte génétique différent des mutants *gld-1*; *gld-2* dans un cas ou *gld-3*; *nos-3* dans l'autre cas. En effet, j'ai moi aussi observé une différence significative entre la longueur des extensions dans deux différents mutants GLP-1 chez lesquels l'identité de cellule souche des cellules germinales était assurée par la perte de *gld-1* et *gld-2*. En effet, alors que les mutants *gld-2(q497)*; *gld-1(q485)*; *glp-1(q175)* ont une diminution de leurs extensions comparables aux mutants ayant complètement perdu leur bassin de CSPG, les mutants *gld-2(q497)*; *gld-1(q485)*; *glp-1(e2141)* sont moins affectés dans la morphologie de leur niche (Figure 3.3E). L'explication pourrait donc résider dans la nature des mutations portées par *glp-1* chez ces différents individus. *glp-1(q175)* porte une mutation non-sens dans le domaine extracellulaire de Notch (NECD) et aucune protéine GLP-1 n'est détectée par immunofluorescence, suggérant que ce mutant est nul. De façon intéressante, les allèles *glp-1(e2141)* et *glp-1(q224ts)* partagent en commun une nature thermosensible ainsi que la localisation intracellulaire de leur mutation *missense*. Puisque l'expression de la protéine GLP-1 provenant des mutants *gld-2(q497)*; *gld-1(q485)*; *glp-1(e2141)* ou *gld-3*; *nos-3*; *glp-1(q224ts)* n'est que peu ou pas délétère pour la maturation de la DTC alors que la perte d'expression totale de GLP-1 chez les mutants *gld-2(q497)*; *gld-1(q485)*; *glp-1(q175)* l'est, il est tentant de spéculer que;

1-soit un signal Notch résiduel persiste chez les mutants *glp-1(e2141)* et *glp-1(q224ts)* et est nécessaire pour que la morphologie de la niche soit partiellement ou totalement maintenue par les CSPG, mais est insuffisant pour maintenir seul l'état indifférencié des CSPG,

2-soit l'intégrité du domaine extra-cellulaire de Notch est importante pour maintenir la morphologie de la niche.

Ces possibilités seront discutées dans les deux sections suivantes.

4.2.2.2. La morphologie de la niche sous contrôle de l'activité de la voie Notch?

Par homologie avec la régulation de la niche par les CSG femelles de la Drosophile (Ward et al., 2006), il semble possible que la maturation morphologique de la niche chez *C. elegans* dépende aussi de la voie Notch canonique. Si c'est le cas, mes résultats montrent que le seuil d'activité de la voie Notch requis pour maintenir les CSPG est probablement supérieur à celui nécessaire au maintien de la niche. En effet, les mutants thermosensibles *glp-1(q224ts)* et *glp-1(e2141)* phénocopient les mutants *glp-1(q1750)* nuls pour la perte de prolifération des CSG lorsqu'ils sont mis à température restrictive (25°C) à partir du stade L1 (Kodoyianni et al., 1992), mais pas pour la morphologie de la DTC dans un contexte génétique préservant l'identité des cellules souches germinales (Byrd et al., 2014) et Figure 3.3E. Suivant le même raisonnement, une augmentation du signal Notch pourrait aussi être délétère pour la formation normale des extensions, tel qu'observé chez les mutants *glp-1(ar202)* par opposition aux doubles mutants *gld-2(q497); gld-1(q485)*. Une façon de tester cette hypothèse serait d'inhiber partiellement la voie Notch canonique en aval de l'expression du récepteur chez les mutants *glp-1(ar202)* ainsi que chez les mutants *gld-2(q497); gld-1(q485); glp-1(e2141)* et de regarder l'effet sur la morphologie de la niche. Plusieurs combinaisons pourraient être utilisées. D'une part, la perte de fonction ou la déplétion de *sup-17* ou de *adm-4* (responsables du clivage S2) et, dans une moindre mesure, une diminution des presenilines *sel-12* et *hop-1* (responsables du clivage S3) suppriment la formation de tumeurs chez les mutants *glp-1(ar202)* (Jarriault and Greenwald, 2005; Pepper et al., 2003a). Si la morphologie anormale de la niche est restaurée au même titre que l'identité des cellules germinales chez les mutants *glp-1(ar202)* déplétés d'une de ces protéases, alors on pourra suggérer que les CSPG régulent la morphologie de leur niche via l'activité de la voie Notch canonique. D'autre part, on s'attendrait aussi à aggraver le phénotype de la niche chez des mutants *gld-2(q497); gld-1(q485); glp-1(e2141)* déplétés par

exemple de *sup-17*, alors que cette déplétion chez les mutants *glp-1* nuls ne devrait pas avoir d'effet. Enfin, suivant la même logique, on s'attendrait à générer des défauts morphologiques de la niche en diminuant de la même façon la voie Notch chez les mutants *gld-2(q497); gld-1(q485)* exprimant un récepteur GLP-1 sauvage.

4.2.2.3. Un rôle non canonique de Notch dans la morphologie de la niche?

Dans les cas contraires à ceux mentionnés ci-haut, soit si des changements dans l'activité de la voie Notch n'ont pas d'incidence sur la structure de la DTC, on pourra considérer que l'intégrité du récepteur Notch, plutôt la voie de signalisation qu'il initie, est cruciale pour la régulation de la niche par les cellules souches germinales chez *C. elegans*. Dans le cadre de cette éventualité, la nature transmembranaire du récepteur Notch et des ligands DSL, ainsi que la force d'interaction considérable mise en jeu lors de leur liaison (Ahimou et al., 2004), permettrait de leur concevoir un rôle non canonique dans l'adhésion cellulaire (Akihiko et al., 2010; Murata et al., 2014). Une telle fonction pourrait favoriser la croissance des extensions de la DTC exprimant LAG-2 sur un tapis cellulaire de CSPG exprimant GLP-1. Si tel était le cas, toute mutation chez le récepteur ou le ligand qui diminuerait la force de leur interaction affecterait probablement la formation des extensions. Cette hypothèse s'accorde bien avec la pénétrance des phénotypes de la niche visualisée chez les différents mutants *glp-1*. Par exemple, tel que mentionné au paragraphe précédent, les mutants *glp-1* ayant une substitution dans le NICD (*glp-1(e2141)* et *glp-1(q224)*) montrent des niches morphologiquement plus normales que les mutants *glp-1* ayant une mutation dans le NECD (*glp-1(q175)*) (Byrd et al., 2014) et Figure 3.3E. Ceci pourrait s'expliquer par une perte totale de l'interaction GLP-1/LAG-2 chez les mutants *glp-1* nuls alors que les récepteurs GLP-1 portant une mutation dans le NICD pourraient encore lier LAG-2 et promouvoir la croissance des extensions indépendamment de la voie Notch canonique. Il est toutefois difficile de déterminer réellement l'effet de chacune de ces mutations sur la force d'interaction entre GLP-1 et LAG-2. En effet, tel que démontré par l'étude de Ahimou et ses collègues (discutée dans la section 1.4.5), bien que des substitutions dans le NICD n'empêchent pas la liaison Notch/Delta, elles peuvent diminuer considérablement la force d'interaction entre les

deux protéines (Ahimou et al., 2004). Ce phénomène pourrait d'ailleurs expliquer pourquoi les extensions de la DTC chez les mutants *gld-2(q497)*; *gld-1(q485)*; *glp-1(e2141)* sont plus petites que celles retrouvées chez les DTC provenant de vers sauvages (Figure 3.3E).

Une observation semble toutefois contredire l'hypothèse que GLP-1 promeut la formation des extensions via un rôle dans l'adhésion cellulaire. Il s'agit d'un point discuté précédemment, qui confronte aussi le rôle potentiel des extensions dans régulation de la taille de zone mitotique : les extensions s'étalent au-delà la frontière mitose/méiose chez l'adulte plus âgé. Tel que mentionné précédemment, cette frontière a toutefois un caractère arbitraire et des cellules mitotiques sont retrouvées dans la zone de transition (Hansen et al., 2004a). De plus, la localisation de GLP-1, telle que visualisée par immunofluorescence, montre que la protéine peut être retrouvée au-delà de la zone mitotique même si elle y est moins abondante (Crittenden et al., 1994). Enfin, mes résultats démontrent qu'une fois formées, ces extensions sont stables c'est-à-dire qu'elles ne se rétractent pas si les CSPG de la zone mitotique sous-jacente se différencient (Figure 3.2C).

Bien que ces observations réconcilient l'étendue spatiale des extensions avec le rôle de GLP-1 comme molécule d'adhésion soutenant leur formation, certains contrôles devront être effectués pour valider cette hypothèse. Premièrement, il faudrait regarder, chez les vers plus âgés, si les extensions les plus proximales co-localisent avec la présence de la protéine GLP-1 dans la zone méiotique. Deuxièmement, il serait intéressant de comparer la morphologie de la niche chez les vers *glp-1(ar202)* déplétés de la preseniline *hop-1* (tel que décrit dans la section précédente) avec celle des vers mutants pour *lag-2*, en utilisant l'allèle hypomorphe *lag-2(q420)*. Cet allèle thermosensible change le site accepteur d'épissage, résultant probablement en un épissage non efficace du deuxième intron (Henderson et al., 1994). Dans l'hypothèse de l'adhésion comme force motrice pour l'extension des protrusions de la DTC, la déplétion de *hop-1* ne devrait pas avoir d'effet alors que la perte de *lag-2* devrait accentuer le phénotype de la niche. L'avantage de comparer la morphologie de la niche dans ces deux conditions expérimentales est qu'elles permettent de supprimer similairement les tumeurs proximales chez les mutants *glp-1(ar202)* (19% de suppression pour *hop-1(RNAi)* contre 25% pour *lag-2(q420)*) (Pepper et al., 2003a). Le pourcentage de suppression pourrait donc être

utilisé comme rapporteur de l'activité Notch, permettant d'assurer que l'effet visualisé n'est pas une conséquence d'une diminution inégale de l'activité canonique de Notch dans ces deux cas.

En accord avec les deux hypothèses présentées dans ces deux dernières sections, Byrd et ses collègues ont constaté, sans toutefois l'expliquer, que la morphologie de la niche était affectée chez les mutants *lag-2* hétérozygotes, mais pas chez les mutants *fbf-1*, bien que le nombre de CSPG, donc aussi l'ensemble de la zone mitotique, soit diminué similairement dans les deux cas. Ces résultats s'expliquent facilement si on considère que l'interaction GLP-1/LAG-2, ou qu'une cible de la voie Notch autre que FBF, régule la maturation de la niche.

4.2.3. Comment la formation des extensions est-elle initiée au cours du développement?

Si GLP-1 est nécessaire à l'acquisition d'une morphologie normale de la DTC, il ne participe probablement pas au signal initiant leur croissance. En effet, tel que mentionné précédemment, GLP-1 est exprimé par les CSPG durant les stades larvaires lorsque la niche ne forme pas encore de protrusions membranaires. De plus, on peut parfois observer des extensions chez les mutants *glp-1(e2141)*, mais ces extensions sont structurellement différentes de celles observées chez les DTCs provenant de vers sauvages (Figure 3.4B). Certaines différences dans le comportement de la niche et l'organisation de la gonade entre les stades larvaires et adulte peuvent être considérées dans l'effort d'identification de ce signal. Par exemple, seulement pendant les stades larvaires, la niche est aidée par les cellules *sheath* pour son rôle dans la prolifération des CSPG et promeut l'élongation de la gonade grâce à sa fonction migratoire. Il serait donc concevable que l'arrêt de la migration ou qu'un signal des cellules *sheath* soit impliqué dans l'initiation de la croissance des extensions de la DTC.

4.2.3.1. L'arrêt de la migration de la DTC, une condition à la croissance de ses extensions?

Puisque l'arrêt de la migration de la DTC au stade adulte corrèle temporellement avec la formation des extensions, il est possible ces deux processus soit mutuellement exclusifs. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé des mutants pour lesquels une migration perpétuelle de la DTC a été rapportée; les mutants *vab-3(e1769)* (Meighan and Schwarzbauer, 2007). Bien que ces mutants montrent une forte pénétrance pour les défauts morphologiques de leur niche, la contribution de l'aspect migratoire de la DTC dans ce phénomène reste irrésolue. En effet, un autre allèle de *vab-3*, *vab-3(e648)*, qui ne montre pas de différences majeures dans l'élongation de la gonade par rapport aux vers sauvages, présente des défauts morphologiques de la niche semblables aux mutants *vab-3(e1769)*. Bien que n'excluant pas l'hypothèse de départ, ces résultats suggèrent que *vab-3* a un rôle dans la formation des extensions qui est indépendant de ses fonctions dans la migration de la DTC. Des contrôles devront être effectués pour adresser l'ensemble de ces possibilités. Par exemple, d'autres mutants générant une migration perpétuelle des DTC pourraient être analysés pour la morphologie de leur niche. Cependant, il demeure incertain si ces régulateurs ne font que ralentir momentanément la dernière phase de migration de la DTC, tel que récemment documenté pour la perte de MIG-39, une protéine sans homologue notoire ayant un domaine zinc-finger et qui agit de façon autonome à la cellule au sein de la DTC (Kikuchi et al., 2015). Cette nuance est importante puisque la grande variabilité dans la longueur des extensions au sein de différents individus pourrait masquer l'effet de tels régulateurs sur la maturation de la niche, notamment dans les cas où le délai dans l'arrêt de la migration serait trop court (Wong et al., 2013). CCDC-55, une protéine à domaine superhélice conservée, mais dont la fonction est inconnue et CACN-1, une autre protéine à domaine superhélice homologue de cactin (*IKB/cactus interactor*) régulent aussi la cessation de migration chez la DTC de façon autonome à la cellule (Kovacevic et al., 2012; Tannoury et al., 2010). Cependant, il n'est pas clair si la migration de la DTC au-delà du point d'arrêt habituel est temporaire ou permanente lorsque ces protéines sont déplétées.

Puisque les mutants *vab-3(e648)* présentant une élongation de leur gonade similaire à celle des vers sauvages, la raison de la perte de morphologie normale de la niche chez cet allèle demeure inconnue. Des pistes de réponse peuvent toutefois être trouvées en regardant quelles sont les cibles caractérisées de VAB-3 dans d'autres organismes. L'étude de Asami et ses collègues montre que les niveaux des protéines PAR sont diminués chez les progéniteurs neuronaux des mutants Pax6 (Asami et al., 2011). Or les protéines PAR sont impliquées dans la spécification d'autre type de protrusions riches en microtubules: celles émanant des astrocytes ainsi que les axones des neurones (Parker et al., 2013; Shi et al., 2003). Pour déterminer si la perte de formation des multiples extensions chez les DTC provenant de mutants *vab-3* est secondaire à une dérégulation des protéines PAR, j'ai regardé la morphologie de la niche chez des mutants *par-3*. Celle-ci s'est révélée semblable à ce qui est observé chez les vers sauvages (résultats non montrés). Puisque PAR-6 et PAR-3 peuvent exister en des complexes différents chez *C. elegans*, l'analyse de la DTC devra aussi être effectuée chez les mutants *par-6*.

4.2.3.2. Quels rôles pour l'élongation de la gonade dans la formation des extensions?

Lorsque l'on compile les observations faites à travers différentes études, on remarque un dénominateur commun à la perte des extensions. En effet, la perte de *gon-1*, *cct-1*, *cct-6*, *glp-1*, ou de *lag-2* a non seulement en commun la perte des extensions, mais aussi un arrêt précoce dans l'élongation de la gonade (Blelloch et al., 1999; Crittenden et al., 2006; Henderson et al., 1994; Lundin et al., 2008). Il est certes envisageable que la perte de ces protéines affectent la morphologie de la niche par un mécanisme propre à chacune; CCT-1 et CCT-6 sont des chaperonnes de la tubuline, et pourraient affecter structurellement la DTC alors que la metalloprotéase GON-1 affecte non seulement la morphologie de la DTC, mais aussi celle des cellules *sheath* (Blelloch et al., 1999). On peut toutefois se demander si l'élongation normale de la gonade, plutôt que la fonction migratoire de la DTC, est importante pour la maturation de la niche. Une des conséquences notables d'une élongation normale de la gonade est la position relative qu'auront les différentes cellules de la gonade somatique les

unes par rapport aux autres et par rapport aux cellules germinales. Dans les gonades adultes provenant de mutants qui préviennent cette élongation (soit dans les cas cités ci-haut), la DTC se retrouve proche des cellules *sheath* et les cellules *sheath* se retrouvent en contact avec des cellules mitotiques, générant la formation de tumeurs proximales (phénotype Pro). Ces deux particularités anatomiques sont aussi retrouvées chez les mutants *glp-1(ar202)* qui ont une longueur de gonade légèrement inférieure à la normale (Figure 1.16). On peut donc noter qu'au stade adulte, la perte du rôle des cellules *sheath* dans le maintien des CSPG corrèle temporellement avec le début de la formation des extensions et que dans les cas où les cellules *sheath* continuent d'exercer leur influence sur les CSPG (lors du phénotype Pro), les extensions ne se forment plus de la même façon. Bien que cette corrélation doive être vérifiée par l'utilisation d'autres mutants Pro, elle permet de suggérer qu'il existe peut-être une communication entre la niche, les cellules germinales et les cellules *sheath* pour la formation des extensions.

Chez la Drosophile, l'intégration de signaux provenant des cellules de la niche et des cellules de support de la niche régule la formation de cytonèmes importants pour le maintien des CSG (Rojas-Rios et al., 2012). Il est tentant de spéculer qu'une telle communication existe chez *C. elegans* et qu'elle passe par la croissance de protrusions membranaires émanant de la niche vers les cellules *sheath*. La longueur maximale des extensions chez les adultes âgés, tel que décrit par Crittenden et ses collègues, semble corrélée avec la position des noyaux des cellules *sheath* de la paire Sh1 qui sont situés en proximal de la frontière méiose/mitose (Figure 1.14). Cependant, un contact direct entre les deux cellules somatiques est envisageable avant l'atteinte de cette distance puisque ces cellules *sheath* étendent aussi des protrusions membranaires vers la zone mitotique. Il serait intéressant d'observer *in vivo*, à l'aide de marqueurs pour chacun des deux types cellulaires, si la DTC et la cellule *sheath* la plus distale établissent des contacts localement. Aussi, l'utilisation de mutants inhibant la formation de cellules *sheath* permettrait de déterminer si elles ont un quelconque rôle dans la maturation de la niche. En ce sens, la perte de CKI-1 (inhibiteur de CDK) offre des conditions idéales puisqu'elle entraîne le remplacement des cellules *sheath* par des DTCs surnuméraires, n'empêchant donc pas la prolifération des cellules germinales en absence de cellules *sheath* (Kostic et al., 2003). L'ablation des cellules *sheath* à la transition L4/adulte serait un autre

moyen de répondre à cette question. Enfin, à la lumière de ces nouvelles considérations, une dernière expérience permettrait de mieux caractériser la contribution potentielle de l'intégrité du récepteur Notch, par rapport à celle des cellules *sheath*, dans les changements morphologiques encourus par la niche chez les mutants *glp-1(ar202)* gain de fonction. Puisque le phénotype Pro est en quelque sorte un rapporteur de la localisation des cellules *sheath*, alors l'utilisation d'un *enhancer* du phénotype Pro, à température permissive pour l'allèle *glp-1(ar202)* (donc à une température affectant moindrement le récepteur GLP-1), permettrait de déterminer la contribution des cellules *sheath* au phénotype de la niche. La perte du récepteur de l'insuline *daf-2* permettrait de satisfaire de telles conditions (Michaelson et al., 2010). À l'inverse, la suppression du phénotype Pro, à température restrictive pour l'allèle *glp-1(ar202)*, vérifierait la contribution de l'intégrité du récepteur GLP-1 au phénotype de la niche. L'ablation des cellules *sheath* proximales dans ce contexte permettrait de satisfaire de telles conditions (Killian and Hubbard, 2005).

4.3. Perspectives

Dans la régulation de la polarité intrinsèque, le microenvironnement cellulaire n'a que peu d'impact sur le destin des cellules. Ce type de régulation est prédominant lors du développement et de plus en plus d'évidences montrent que la machinerie du cycle cellulaire, hautement sollicitée à ce moment, y joue un rôle important. Puisque la progression du cycle cellulaire et la répartition inégale des déterminants cellulaires sont tous deux essentiels à la division asymétrique, le mécanisme par lequel les régulateurs mitotiques influencent la polarité intrinsèque reste difficile à déterminer. La découverte des cibles spécifiques de ces régulateurs dans la polarité pourrait éventuellement permettre de découpler la dualité de leurs fonctions dans ces deux processus développementaux. Un aspect intéressant de mon étude est qu'elle montre justement que deux cyclines, *cyb-2.1* et *cyb-2.2*, peuvent être remplacées par les autres cyclines de type B pour leur rôle dans le cycle cellulaire, mais pas pour leurs fonctions dans la division asymétrique où elles jouent un rôle dans la stabilisation d'une des protéines majeures de la polarité; PAR-6.

De façon générale, la question suivante est soulevée par l'ensemble de ces découvertes : quel est l'avantage d'utiliser des régulateurs du cycle cellulaire pour contrôler la polarité? Évidemment, ces régulateurs sont temporellement exprimés au bon moment pour leur rôle dans la division asymétrique, soit lorsque la cellule doit établir son axe de polarité. Une modulation de l'activité de ces régulateurs dans un contexte développemental ou environnemental particulier pourrait peut-être même faciliter un changement dans le mode de division adopté. Par exemple, il est généralement admis que certaines cellules souches se divisent moins fréquemment en période d'homéostasie chez l'adulte que lors des périodes d'expansion au cours du développement (Li and Clevers, 2010). On peut donc imaginer qu'il existe une modulation dans l'activité des régulateurs du cycle cellulaire au cours de ces périodes et que cette modulation puisse influencer le passage d'un mode de division symétrique, prédominant durant la phase d'expansion, à un mode de division asymétrique, prédominant chez l'adulte (Morrison and Kimble, 2006). En utilisant des régulateurs communs, la cellule pourrait orchestrer efficacement le couplage entre cycle cellulaire et polarité de façon à répondre rapidement à des changements dans la demande en cellules

souches au cours du développement. Mes résultats et d'autres données montrent aussi que le seuil d'activité des régulateurs mitotiques pour leur rôle dans la polarité est probablement plus bas que pour leur rôle dans le cycle cellulaire (Tio et al., 2001). On peut donc même se demander si ces régulateurs pourraient être exprimés à des niveaux suffisants pour assumer une fonction dans la polarité de cellules typiquement quiescentes. Globalement, l'ensemble des études montrant un rôle spécifique des régulateurs du cycle cellulaire dans la polarité ouvre la porte à un nouveau champ de recherche qui devra rationaliser les liens entre ces machineries, toutes deux essentielles au maintien de l'intégrité de et au développement de tout organisme.

La deuxième étude abordée dans cette thèse laisse plusieurs questions en suspens. La plus évidente concerne le rôle des extensions dans le maintien des CSPG. Bien qu'aucune de mes données ne permette d'y répondre, on peut penser que ces extensions pourraient permettre de propager le signal Notch aux CSPG les plus distales chez l'adulte. L'analyse du mode de division et du comportement des CSPG contactant les extensions pourra initier la caractérisation de leurs fonctions potentielles. La plus mystérieuse des questions concerne probablement la régulation des CSPG par la niche aux stades larvaires, lorsque la majorité des CSPG ne contactent pas directement la DTC. En effet, tel que mentionné plusieurs fois dans cette thèse, la nature transmembranaire des ligands et du récepteur de la voie Notch au sein de la lignée germinale semble peu compatible avec le maintien d'une zone mitotique à distance de la niche. Plusieurs possibilités peuvent toutefois être considérées pour tenter d'expliquer ce paradoxe apparent dans la communication niche/cellules souches chez *C. elegans*. Cinq et ses collègues ont montré qu'il existe différentes populations de CSPG. On peut donc imaginer que chez l'adulte, certaines CSPG pourraient répondre au signal Notch initié par LAG-2, probablement celles en contact direct avec la DTC ou ses extensions, alors que les autres pourraient former une population régulée d'une façon indépendante de ce signal ou être programmées pour effectuer un certain nombre de divisions avant d'entamer leur différenciation. Dans le premier cas, le contact des cellules *sheath* avec les CSPG plus proximales pourrait permettre maintenir les CSPG proximales jusqu'à ce que les extensions de la DTC recouvrent l'ensemble de la zone mitotique. Dans le deuxième cas, les CSPG proximales pourraient être des progéniteurs en période d'amplification transitoire et

indépendante des signaux de la niche, similairement à ce qui est observé pour les cystocytes chez la *Drosophile*. Malgré l'absence de compartiment anatomique visible au sein de la lignée germinale, certaines CSPG se divisent en groupe alors que d'autres non (Maciejowski et al., 2006). Ces divisions conjointes pourraient représenter une telle amplification alors que les divisions de cellules isolées pourraient représenter des divisions d'auto-renouvellement des cellules souches. Il serait donc intéressant de tenir compte de ce phénomène lors de futures analyses de l'orientation des divisions des CSPG par rapport aux extensions de la niche.

Une autre particularité intéressante de la DTC mise en relief par des études ultérieures et par les résultats montrés au chapitre 3 est le nombre remarquable de similarités qu'elle partage avec un autre type de cellule spécialisée dans la communication cellulaire : le neurone. Ainsi, la vitesse de croissance des extensions ressemble plus à celle du cône axonal qu'à celle des filopodia, leur structure est enrichie en microtubules, et la cellule dont elles émanent, la DTC, répond à des molécules de guidances aussi utilisées dans la croissance neuronale tel que UNC-6/netrin (Merz et al., 2001; Wong et al., 2013). Aussi, j'ai montré qu'un régulateur conservé de l'identité neuronale, le facteur de transcription VAB-3 qui régule l'extension et la formation des axones et des dendrites chez *C. elegans* (Yoshimura et al., 2008), est aussi essentiel à la maturation morphologique de la niche au sein la lignée germinale (Figure 3.6, 3.7). Si la niche est une cellule qui étend des extensions dans le but de communiquer avec d'autres cellules, on peut se demander si cette communication se fait uniquement avec les CSPG. Tel que mentionné précédemment, une partie de la réponse pourrait provenir de la remarquable corrélation entre un positionnement anormal des cellules *sheath* et la perte de formation des extensions. Ceci permet d'émettre l'hypothèse que ces deux types cellulaires de la gonade somatique communiquent entre eux, peut-être via leurs extensions réciproques. Un précédent de ce type existe dans la lignée germinale de la *Drosophile* (Rojas-Rios et al., 2012) et de plus en plus d'exemples montrent que plusieurs cellules utilisent des protrusions membranaires pour véhiculer des molécules à distance, vers une cellule cible. Ainsi, ce type de communication n'est pas réservé qu'aux neurones et son investigation dans divers type cellulaires promet d'être un champ excitant à explorer dans l'avenir.

L'étude présentée au chapitre 3 s'inscrit donc dans la perspective d'adresser la communication niche/cellules souches spatialement et temporellement au cours du développement, dans le but de la montrer comme une entité dynamique et multidirectionnelle entre les différentes cellules présentes au sein de l'environnement des cellules souches.

Bibliographie

Aceto, D., Beers, M., and Kemphues, K.J. (2006). Interaction of PAR-6 with CDC-42 is required for maintenance but not establishment of PAR asymmetry in *C. elegans*. *Developmental biology* 299, 386-397.

Adams, A.E., Johnson, D.I., Longnecker, R.M., Sloat, B.F., and Pringle, J.R. (1990). CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* 111, 131-142.

Ahimou, F., Mok, L.P., Bardot, B., and Wesley, C. (2004). The adhesion force of Notch with Delta and the rate of Notch signaling. *The Journal of cell biology* 167, 1217-1229.

Ahringer, J., Rosenquist, T.A., Lawson, D.N., and Kimble, J. (1992). The *Caenorhabditis elegans* sex determining gene *fem-3* is regulated post-transcriptionally. *The EMBO journal* 11, 2303-2310.

Akihiko, M., Kazuki, O., Seiji, S., Masahiro, K., Tomohisa, H., Hideo, Y., Juan Carlos, Z.-P., Kensuke, M., Sachiko, A.-T., Sawako, M., *et al.* (2010). A Notch Ligand, Delta-Like 1 Functions As an Adhesion Molecule for Mast Cells. *The Journal of Immunology*.

Akihiko, M., Miya, Y., Mari, H., Kazuki, O., Lan, Z., Seiji, S., Hideo, Y., and Shin-Ichi, H. (2014). An Evolutionary-Conserved Function of Mammalian Notch Family Members as Cell Adhesion Molecules. *PloS one*.

Aladjem, M.I. (2007). Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans. *Nature reviews Genetics* 8, 588-600.

Albertson, D.G. (1984). Formation of the first cleavage spindle in nematode embryos. *Developmental biology* 101, 61-72.

Amini, R., Goupil, E., Labella, S., Zetka, M., Maddox, A.S., Labbe, J.C., and Chartier, N.T. (2014). *C. elegans* Anillin proteins regulate intercellular bridge stability and germline syncytial organization. *The Journal of cell biology* 206, 129-143.

Artavanis-Tsakonas, S., Delidakis, C., and Fehon, R.G. (1991). The Notch locus and the cell biology of neuroblast segregation. *Annual review of cell biology* 7, 427-452.

Artavanis-Tsakonas, S., and Simpson, P. (1991). Choosing a cell fate: a view from the Notch locus. *Trends in genetics : TIG* 7, 403-408.

- Asami, M., Pilz, G.A., Ninkovic, J., Godinho, L., Schroeder, T., Huttner, W.B., and Gotz, M. (2011). The role of Pax6 in regulating the orientation and mode of cell division of progenitors in the mouse cerebral cortex. *Development* *138*, 5067-5078.
- Ashcroft, N.R., Srayko, M., Kosinski, M.E., Mains, P.E., and Golden, A. (1999). RNA-Mediated interference of a *cdc25* homolog in *Caenorhabditis elegans* results in defects in the embryonic cortical membrane, meiosis, and mitosis. *Developmental biology* *206*, 15-32.
- Atwood, S.X., Chabu, C., Penkert, R.R., Doe, C.Q., and Prehoda, K.E. (2007). Cdc42 acts downstream of Bazooka to regulate neuroblast polarity through Par-6 aPKC. *Journal of cell science* *120*, 3200-3206.
- Austin, J., and Kimble, J. (1987). *glp-1* is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. *Cell* *51*, 589-599.
- Bao, Z.Z., and Cepko, C.L. (1997). The expression and function of Notch pathway genes in the developing rat eye. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *17*, 1425-1434.
- Baum, P.D., and Garriga, G. (1997). Neuronal migrations and axon fasciculation are disrupted in *ina-1* integrin mutants. *Neuron* *19*, 51-62.
- Beach, D., Durkacz, B., and Nurse, P. (1982). Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* *300*, 706-709.
- Beatty, A., Morton, D., and Kemphues, K. (2010). The *C. elegans* homolog of *Drosophila* Lethal giant larvae functions redundantly with PAR-2 to maintain polarity in the early embryo. *Development* *137*, 3995-4004.
- Beatty, A., Morton, D.G., and Kemphues, K. (2013). PAR-2, LGL-1 and the CDC-42 GAP CHIN-1 act in distinct pathways to maintain polarity in the *C. elegans* embryo. *Development* *140*, 2005-2014.
- Beers, M., and Kemphues, K. (2006). Depletion of the co-chaperone CDC-37 reveals two modes of PAR-6 cortical association in *C. elegans* embryos. *Development* *133*, 3745-3754.
- Bellaïche, Y., Radovic, A., Woods, D.F., Hough, C.D., Parmentier, M.L., O'Kane, C.J., Bryant, P.J., and Schweisguth, F. (2001). The Partner of Inscuteable/Discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in *Drosophila*. *Cell* *106*, 355-366.
- Benkemoun, L., Descoteaux, C., Chartier, N.T., Pintard, L., and Labbe, J.C. (2014). PAR-4/LKB1 regulates DNA replication during asynchronous division of the early *C. elegans* embryo. *The Journal of cell biology* *205*, 447-455.

- Benton, R., and St Johnston, D. (2003). *Drosophila* PAR-1 and 14-3-3 inhibit Bazooka/PAR-3 to establish complementary cortical domains in polarized cells. *Cell* *115*, 691-704.
- Bernstein, D., Hook, B., Hajarnavis, A., Opperman, L., and Wickens, M. (2005). Binding specificity and mRNA targets of a *C. elegans* PUF protein, FBF-1. *Rna* *11*, 447-458.
- Berry, L.W., Westlund, B., and Schedl, T. (1997). Germ-line tumor formation caused by activation of glp-1, a *Caenorhabditis elegans* member of the Notch family of receptors. *Development* *124*, 925-936.
- Berset, T., Hoier, E.F., Battu, G., Canevascini, S., and Hajnal, A. (2001). Notch inhibition of RAS signaling through MAP kinase phosphatase LIP-1 during *C. elegans* vulval development. *Science* *291*, 1055-1058.
- Betschinger, J., Eisenhaber, F., and Knoblich, J.A. (2005). Phosphorylation-induced autoinhibition regulates the cytoskeletal protein Lethal (2) giant larvae. *Current biology : CB* *15*, 276-282.
- Betschinger, J., Mechtler, K., and Knoblich, J.A. (2006). Asymmetric segregation of the tumor suppressor brat regulates self-renewal in *Drosophila* neural stem cells. *Cell* *124*, 1241-1253.
- Bienkowska, D., and Cowan, C.R. (2012). Centrosomes can initiate a polarity axis from any position within one-cell *C. elegans* embryos. *Current biology : CB* *22*, 583-589.
- Bischoff, M., Gradilla, A.C., Seijo, I., Andres, G., Rodriguez-Navas, C., Gonzalez-Mendez, L., and Guerrero, I. (2013). Cytonemes are required for the establishment of a normal Hedgehog morphogen gradient in *Drosophila* epithelia. *Nature cell biology* *15*, 1269-1281.
- Blaumueller, C.M., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* *90*, 281-291.
- Blelloch, R., Anna-Arriola, S.S., Gao, D., Li, Y., Hodgkin, J., and Kimble, J. (1999). The gon-1 gene is required for gonadal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* *216*, 382-393.
- Blelloch, R., and Kimble, J. (1999). Control of organ shape by a secreted metalloprotease in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *399*, 586-590.
- Bolton, V.N., Oades, P.J., and Johnson, M.H. (1984). The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. *Journal of embryology and experimental morphology* *79*, 139-163.

- Boxem, M., Srinivasan, D.G., and van den Heuvel, S. (1999). The *Caenorhabditis elegans* gene *ncc-1* encodes a *cdc2*-related kinase required for M phase in meiotic and mitotic cell divisions, but not for S phase. *Development* *126*, 2227-2239.
- Boxem, M., and van den Heuvel, S. (2001). *lin-35* Rb and *cki-1* Cip/Kip cooperate in developmental regulation of G1 progression in *C. elegans*. *Development* *128*, 4349-4359.
- Boyd, L., Guo, S., Levitan, D., Stinchcomb, D.T., and Kemphues, K.J. (1996). PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in *C. elegans* embryos. *Development* *122*, 3075-3084.
- Brajenovic, M., Joberty, G., Kuster, B., Bouwmeester, T., and Drewes, G. (2004). Comprehensive proteomic analysis of human Par protein complexes reveals an interconnected protein network. *The Journal of biological chemistry* *279*, 12804-12811.
- Brauchle, M., Baumer, K., and Gönczy, P. (2003). Differential activation of the DNA replication checkpoint contributes to asynchrony of cell division in *C. elegans* embryos. *Current biology : CB* *13*, 819-827.
- Brawley, C., and Matunis, E. (2004). Regeneration of male germline stem cells by spermatogonial dedifferentiation in vivo. *Science* *304*, 1331-1334.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *77*, 71-94.
- Brodigan, T.M., Liu, J., Park, M., Kipreos, E.T., and Krause, M. (2003). Cyclin E expression during development in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* *254*, 102-115.
- Bruinsma, W., Raaijmakers, J.A., and Medema, R.H. (2012). Switching Polo-like kinase-1 on and off in time and space. *Trends in biochemical sciences* *37*, 534-542.
- Budirahardja, Y., and Gönczy, P. (2008). PLK-1 asymmetry contributes to asynchronous cell division of *C. elegans* embryos. *Development* *135*, 1303-1313.
- Burger, J., Merlet, J., Tavernier, N., Richaudeau, B., Arnold, A., Ciosk, R., Bowerman, B., and Pintard, L. (2013). CRL(2LRR-1) E3-ligase regulates proliferation and progression through meiosis in the *Caenorhabditis elegans* germline. *PLoS genetics* *9*, e1003375.
- Burrows, A.E., Scurman, B.K., Kosinski, M.E., Richie, C.T., Sadler, P.L., Schumacher, J.M., and Golden, A. (2006). The *C. elegans* Myt1 ortholog is required for the proper timing of oocyte maturation. *Development* *133*, 697-709.
- Byrd, D.T., Knobel, K., Affeldt, K., Crittenden, S.L., and Kimble, J. (2014). A DTC niche plexus surrounds the germline stem cell pool in *Caenorhabditis elegans*. *PloS one* *9*, e88372.

- Caussinus, E., and Gonzalez, C. (2005). Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. *Nature genetics* *37*, 1125-1129.
- Cazales, M., Schmitt, E., Montembault, E., Dozier, C., Prigent, C., and Ducommun, B. (2005). CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell cycle* *4*, 1233-1238.
- Chamberlin, H.M., and Sternberg, P.W. (1995). Mutations in the *Caenorhabditis elegans* gene *vab-3* reveal distinct roles in fate specification and unequal cytokinesis in an asymmetric cell division. *Developmental biology* *170*, 679-689.
- Chan, S.S., Zheng, H., Su, M.W., Wilk, R., Killeen, M.T., Hedgecock, E.M., and Culotti, J.G. (1996). UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell* *87*, 187-195.
- Chapouton, P., Skupien, P., Hesl, B., Coolen, M., Moore, J.C., Madelaine, R., Kremmer, E., Faus-Kessler, T., Blader, P., Lawson, N.D., *et al.* (2010). Notch activity levels control the balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *30*, 7961-7974.
- Chartier, N.T., Salazar Ospina, D.P., Benkemoun, L., Mayer, M., Grill, S.W., Maddox, A.S., and Labbé, J.C. (2011). PAR-4/LKB1 mobilizes nonmuscle myosin through anillin to regulate *C. elegans* embryonic polarization and cytokinesis. *Current biology : CB* *21*, 259-269.
- Chase, D., Serafinas, C., Ashcroft, N., Kosinski, M., Longo, D., Ferris, D.K., and Golden, A. (2000). The polo-like kinase PLK-1 is required for nuclear envelope breakdown and the completion of meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Genesis* *26*, 26-41.
- Cheeks, R.J., Canman, J.C., Gabriel, W.N., Meyer, N., Strome, S., and Goldstein, B. (2004). *C. elegans* PAR proteins function by mobilizing and stabilizing asymmetrically localized protein complexes. *Current biology : CB* *14*, 851-862.
- Chen, N., and Greenwald, I. (2004). The lateral signal for LIN-12/Notch in *C. elegans* vulval development comprises redundant secreted and transmembrane DSL proteins. *Developmental cell* *6*, 183-192.
- Chen, P., and Ellis, R.E. (2000). TRA-1A regulates transcription of *fog-3*, which controls germ cell fate in *C. elegans*. *Development* *127*, 3119-3129.
- Chen, X., and Macara, I.G. (2005). Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nature cell biology* *7*, 262-269.
- Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Roussel, M.F., Roberts, J.M., and Sherr, C.J. (1999). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *The EMBO journal* *18*, 1571-1583.

- Chin-Sang, I.D., and Spence, A.M. (1996). *Caenorhabditis elegans* sex-determining protein FEM-2 is a protein phosphatase that promotes male development and interacts directly with FEM-3. *Genes & development* *10*, 2314-2325.
- Chisholm, A.D., and Horvitz, H.R. (1995). Patterning of the *Caenorhabditis elegans* head region by the Pax-6 family member *vab-3*. *Nature* *377*, 52-55.
- Choksi, S.P., Southall, T.D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B.E., van Steensel, B., Micklem, G., and Brand, A.H. (2006). Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Developmental cell* *11*, 775-789.
- Christensen, S., Kodoyianni, V., Bosenberg, M., Friedman, L., and Kimble, J. (1996). *lag-1*, a gene required for *lin-12* and *glp-1* signaling in *Caenorhabditis elegans*, is homologous to human CBF1 and *Drosophila* Su(H). *Development* *122*, 1373-1383.
- Cicalese, A., Bonizzi, G., Pasi, C.E., Faretta, M., Ronzoni, S., Giulini, B., Brisken, C., Minucci, S., Di Fiore, P.P., and Pelicci, P.G. (2009). The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* *138*, 1083-1095.
- Cinquin, O., Crittenden, S.L., Morgan, D.E., and Kimble, J. (2010). Progression from a stem cell-like state to early differentiation in the *C. elegans* germ line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 2048-2053.
- Cohen, M., Georgiou, M., Stevenson, N.L., Miodownik, M., and Baum, B. (2010). Dynamic filopodia transmit intermittent Delta-Notch signaling to drive pattern refinement during lateral inhibition. *Developmental cell* *19*, 78-89.
- Colombo, K., Grill, S.W., Kimple, R.J., Willard, F.S., Siderovski, D.P., and Gönczy, P. (2003). Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Science* *300*, 1957-1961.
- Conklin, E.G. (1905). The Organization and Cell-Lineage of the Ascidian Egg. *Journal of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 1-19.
- Consortium, C.e.S. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* *282*, 2012-2018.
- Coudreuse, D., and Nurse, P. (2010). Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* *468*, 1074-1079.
- Couwenbergs, C., Labbe, J.C., Goulding, M., Marty, T., Bowerman, B., and Gotta, M. (2007). Heterotrimeric G protein signaling functions with dynein to promote spindle positioning in *C. elegans*. *The Journal of cell biology* *179*, 15-22.

Cowan, C.R., and Hyman, A.A. (2004). Centrosomes direct cell polarity independently of microtubule assembly in *C. elegans* embryos. *Nature* *431*, 92-96.

Cowan, C.R., and Hyman, A.A. (2006). Cyclin E-Cdk2 temporally regulates centrosome assembly and establishment of polarity in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nature cell biology* *8*, 1441-1447.

Cram, E.J., Shang, H., and Schwarzbauer, J.E. (2006). A systematic RNA interference screen reveals a cell migration gene network in *C. elegans*. *Journal of cell science* *119*, 4811-4818.

Crittenden, S., and Kimble, J. (2009). Preparation and immunolabeling of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor protocols* *2009*, pdb prot5216.

Crittenden, S.L., Bernstein, D.S., Bachorik, J.L., Thompson, B.E., Gallegos, M., Petcherski, A.G., Moulder, G., Barstead, R., Wickens, M., and Kimble, J. (2002). A conserved RNA-binding protein controls germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *417*, 660-663.

Crittenden, S.L., Leonhard, K.A., Byrd, D.T., and Kimble, J. (2006). Cellular analyses of the mitotic region in the *Caenorhabditis elegans* adult germ line. *Molecular biology of the cell* *17*, 3051-3061.

Crittenden, S.L., Troemel, E.R., Evans, T.C., and Kimble, J. (1994). GLP-1 is localized to the mitotic region of the *C. elegans* germ line. *Development* *120*, 2901-2911.

Cuenca, A.A., Schetter, A., Aceto, D., Kempfues, K., and Seydoux, G. (2003). Polarization of the *C. elegans* zygote proceeds via distinct establishment and maintenance phases. *Development* *130*, 1255-1265.

D'Souza, B., Meloty-Kapella, L., and Weinmaster, G. (2010). Canonical and non-canonical Notch ligands. *Current topics in developmental biology* *92*, 73-129.

Dalfo, D., Michaelson, D., and Hubbard, E.J. (2012). Sensory regulation of the *C. elegans* germline through TGF-beta-dependent signaling in the niche. *Current biology : CB* *22*, 712-719.

Daniels, B.R., Dobrowsky, T.M., Perkins, E.M., Sun, S.X., and Wirtz, D. (2010). MEX-5 enrichment in the *C. elegans* early embryo mediated by differential diffusion. *Development* *137*, 2579-2585.

De Jussineau, C., Soule, J., Martin, M., Anguille, C., Montcourrier, P., and Alexandre, D. (2003). Delta-promoted filopodia mediate long-range lateral inhibition in *Drosophila*. *Nature* *426*, 555-559.

Deblandre, G.A., Lai, E.C., and Kintner, C. (2001). *Xenopus* neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling. *Developmental cell* *1*, 795-806.

Delattre, M., Leidel, S., Wani, K., Baumer, K., Bamat, J., Schnabel, H., Feichtinger, R., Schnabel, R., and Gönczy, P. (2004). Centriolar SAS-5 is required for centrosome duplication in *C. elegans*. *Nature cell biology* 6, 656-664.

DeRenzo, C., Reese, K.J., and Seydoux, G. (2003). Exclusion of germ plasm proteins from somatic lineages by cullin-dependent degradation. *Nature* 424, 685-689.

Desai, D., Gu, Y., and Morgan, D.O. (1992). Activation of human cyclin-dependent kinases in vitro. *Molecular biology of the cell* 3, 571-582.

Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouche, J.P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., *et al.* (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *Journal of cell science* 117, 2523-2531.

Eckmann, C.R., Crittenden, S.L., Suh, N., and Kimble, J. (2004). GLD-3 and control of the mitosis/meiosis decision in the germline of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 168, 147-160.

Eckmann, C.R., Kraemer, B., Wickens, M., and Kimble, J. (2002). GLD-3, a bicaudal-C homolog that inhibits FBF to control germline sex determination in *C. elegans*. *Developmental cell* 3, 697-710.

Edgar, L.G., and McGhee, J.D. (1988). DNA synthesis and the control of embryonic gene expression in *C. elegans*. *Cell* 53, 589-599.

Edgar, L.G., Wolf, N., and Wood, W.B. (1994). Early transcription in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* 120, 443-451.

Elia, A.E., Cantley, L.C., and Yaffe, M.B. (2003a). Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* 299, 1228-1231.

Elia, A.E., Rellos, P., Haire, L.F., Chao, J.W., Ivins, F.J., Hoepker, K., Mohammad, D., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., and Yaffe, M.B. (2003b). The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* 115, 83-95.

Ellis, R., and Schedl, T. (2007). Sex determination in the germ line. *WormBook : the online review of C elegans biology*, 1-13.

Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D., and Sklar, J. (1991). TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66, 649-661.

- Emery, G., Hutterer, A., Berdnik, D., Mayer, B., Wirtz-Peitz, F., Gaitan, M.G., and Knoblich, J.A. (2005). Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the *Drosophila* nervous system. *Cell* *122*, 763-773.
- Encalada, S.E., Martin, P.R., Phillips, J.B., Lyczak, R., Hamill, D.R., Swan, K.A., and Bowerman, B. (2000). DNA replication defects delay cell division and disrupt cell polarity in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Developmental biology* *228*, 225-238.
- Essers, J., Theil, A.F., Baldeyron, C., van Cappellen, W.A., Houtsmuller, A.B., Kanaar, R., and Vermeulen, W. (2005). Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol* *25*, 9350-9359.
- Etemad-Moghadam, B., Guo, S., and Kemphues, K.J. (1995). Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos. *Cell* *83*, 743-752.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* *106*, 489-498.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* *33*, 389-396.
- Fay, D.S., and Han, M. (2000). Mutations in *cye-1*, a *Caenorhabditis elegans* cyclin E homolog, reveal coordination between cell-cycle control and vulval development. *Development* *127*, 4049-4060.
- Fehon, R.G., Kooh, P.J., Rebay, I., Regan, C.L., Xu, T., Muskavitch, M.A., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* *61*, 523-534.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806-811.
- Fitzgerald, K., and Greenwald, I. (1995). Interchangeability of *Caenorhabditis elegans* DSL proteins and intrinsic signalling activity of their extracellular domains in vivo. *Development* *121*, 4275-4282.
- Fitzgerald, K., Wilkinson, H.A., and Greenwald, I. (1993). *glp-1* can substitute for *lin-12* in specifying cell fate decisions in *Caenorhabditis elegans*. *Development* *119*, 1019-1027.
- Fleming, R.J. (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Seminars in cell & developmental biology* *9*, 599-607.

Forbes, A., and Lehmann, R. (1998). Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development* *125*, 679-690.

Fox, P.M., Vought, V.E., Hanazawa, M., Lee, M.H., Maine, E.M., and Schedl, T. (2011). Cyclin E and CDK-2 regulate proliferative cell fate and cell cycle progression in the *C. elegans* germline. *Development* *138*, 2223-2234.

Francis, R., Barton, M.K., Kimble, J., and Schedl, T. (1995a). *gld-1*, a tumor suppressor gene required for oocyte development in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *139*, 579-606.

Francis, R., Maine, E., and Schedl, T. (1995b). Analysis of the multiple roles of *gld-1* in germline development: interactions with the sex determination cascade and the *glp-1* signaling pathway. *Genetics* *139*, 607-630.

Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M.C., *et al.* (2002). *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Developmental cell* *3*, 85-97.

François, S. (2015). Asymmetric cell division in the *Drosophila* bristle lineage: from the polarization of sensory organ precursor cells to Notch - mediated binary fate decision. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology.

Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., and Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* *408*, 325-330.

Friend, K., Campbell, Z.T., Cooke, A., Kroll-Conner, P., Wickens, M.P., and Kimble, J. (2012). A conserved PUF-Ago-eEF1A complex attenuates translation elongation. *Nature structural & molecular biology* *19*, 176-183.

Fukuyama, M., Gendreau, S.B., Derry, W.B., and Rothman, J.H. (2003). Essential embryonic roles of the CKI-1 cyclin-dependent kinase inhibitor in cell-cycle exit and morphogenesis in *C. elegans*. *Developmental biology* *260*, 273-286.

Fung, T.K., and Poon, R.Y. (2005). A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Seminars in cell & developmental biology* *16*, 335-342.

Furukawa, T., Maruyama, S., Kawaichi, M., and Honjo, T. (1992). The *Drosophila* homolog of the immunoglobulin recombination signal-binding protein regulates peripheral nervous system development. *Cell* *69*, 1191-1197.

Furuta, T., Tuck, S., Kirchner, J., Koch, B., Auty, R., Kitagawa, R., Rose, A.M., and Greenstein, D. (2000). EMB-30: an APC4 homologue required for metaphase-to-anaphase

transitions during meiosis and mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology of the cell* *11*, 1401-1419.

Gaiano, N., Nye, J.S., and Fishell, G. (2000). Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* *26*, 395-404.

Galli, M., Munoz, J., Portegijs, V., Boxem, M., Grill, S.W., Heck, A.J., and van den Heuvel, S. (2011). aPKC phosphorylates NuMA-related LIN-5 to position the mitotic spindle during asymmetric division. *Nature cell biology* *13*, 1132-1138.

Gan, B., Hu, J., Jiang, S., Liu, Y., Sahin, E., Zhuang, L., Fletcher-Sananikone, E., Colla, S., Wang, Y.A., Chin, L., *et al.* (2010). Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature* *468*, 701-704.

Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J.E., Bhattacharya, S., Rideout, W.M., Bronson, R.T., Gardner, H., and Sicinski, P. (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* *114*, 431-443.

Gerhold, A.R., Ryan, J., Vallee-Trudeau, J.N., Dorn, J.F., Labbe, J.C., and Maddox, P.S. (2015). Investigating the regulation of stem and progenitor cell mitotic progression by in situ imaging. *Current biology : CB* *25*, 1123-1134.

Gho, M., and Schweisguth, F. (1998). Frizzled signalling controls orientation of asymmetric sense organ precursor cell divisions in *Drosophila*. *Nature* *393*, 178-181.

Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* *349*, 132-138.

Goehring, N.W., Hoegge, C., Grill, S.W., and Hyman, A.A. (2011a). PAR proteins diffuse freely across the anterior-posterior boundary in polarized *C. elegans* embryos. *The Journal of cell biology* *193*, 583-594.

Goehring, N.W., Trong, P.K., Bois, J.S., Chowdhury, D., Nicola, E.M., Hyman, A.A., and Grill, S.W. (2011b). Polarization of PAR proteins by advective triggering of a pattern-forming system. *Science* *334*, 1137-1141.

Golden, A., Sadler, P.L., Wallenfang, M.R., Schumacher, J.M., Hamill, D.R., Bates, G., Bowerman, B., Seydoux, G., and Shakes, D.C. (2000). Metaphase to anaphase (mat) transition-defective mutants in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology* *151*, 1469-1482.

Goldstein, B., and Hird, S.N. (1996). Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* *122*, 1467-1474.

Goldstein, B., and Macara, I.G. (2007). The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Developmental cell* *13*, 609-622.

Goldstrohm, A.C., Hook, B.A., and Wickens, M. (2008). Regulated deadenylation in vitro. *Methods in enzymology* *448*, 77-106.

Gonczy, P. (2008). Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nature reviews Molecular cell biology* *9*, 355-366.

Gönczy, P., Pichler, S., Kirkham, M., and Hyman, A.A. (1999a). Cytoplasmic dynein is required for distinct aspects of MTOC positioning, including centrosome separation, in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo. *The Journal of cell biology* *147*, 135-150.

Gönczy, P., Schnabel, H., Kaletta, T., Amores, A.D., Hyman, T., and Schnabel, R. (1999b). Dissection of cell division processes in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo by mutational analysis. *The Journal of cell biology* *144*, 927-946.

Goode, S., Melnick, M., Chou, T.B., and Perrimon, N. (1996). The neurogenic genes egghead and brainiac define a novel signaling pathway essential for epithelial morphogenesis during *Drosophila* oogenesis. *Development* *122*, 3863-3879.

Gordon, W.R., Arnett, K.L., and Blacklow, S.C. (2008). The molecular logic of Notch signaling--a structural and biochemical perspective. *Journal of cell science* *121*, 3109-3119.

Gordon, W.R., Roy, M., Vardar-Ulu, D., Garfinkel, M., Mansour, M.R., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2009). Structure of the Notch1-negative regulatory region: implications for normal activation and pathogenic signaling in T-ALL. *Blood* *113*, 4381-4390.

Gotta, M., Abraham, M.C., and Ahringer, J. (2001). CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in *C. elegans*. *Current biology : CB* *11*, 482-488.

Gotta, M., and Ahringer, J. (2001). Distinct roles for Galpha and Gbetagamma in regulating spindle position and orientation in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nature cell biology* *3*, 297-300.

Gotta, M., Dong, Y., Peterson, Y.K., Lanier, S.M., and Ahringer, J. (2003). Asymmetrically distributed *C. elegans* homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo. *Current biology : CB* *13*, 1029-1037.

Gould, K.L., Moreno, S., Owen, D.J., Sazer, S., and Nurse, P. (1991). Phosphorylation at Thr167 is required for *Schizosaccharomyces pombe* p34cdc2 function. *The EMBO journal* *10*, 3297-3309.

Goutte, C., Tsunozaki, M., Hale, V.A., and Priess, J.R. (2002). APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*

embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 775-779.

Greenwald, I. (1985). *lin-12*, a nematode homeotic gene, is homologous to a set of mammalian proteins that includes epidermal growth factor. *Cell* *43*, 583-590.

Greenwald, I., and Kovall, R. (2013). Notch signaling: genetics and structure. *WormBook* : the online review of *C. elegans* biology, 1-28.

Greenwald, I., and Seydoux, G. (1990). Analysis of gain-of-function mutations of the *lin-12* gene of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *346*, 197-199.

Griffin, E.E., Odde, D.J., and Seydoux, G. (2011). Regulation of the MEX-5 gradient by a spatially segregated kinase/phosphatase cycle. *Cell* *146*, 955-968.

Grill, S.W., Gönczy, P., Stelzer, E.H., and Hyman, A.A. (2001). Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature* *409*, 630-633.

Grill, S.W., Howard, J., Schaffer, E., Stelzer, E.H., and Hyman, A.A. (2003). The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science* *301*, 518-521.

Gumienny, T.L., Lambie, E., Hartweg, E., Horvitz, H.R., and Hengartner, M.O. (1999). Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* *126*, 1011-1022.

Guo, S., and Kemphues, K.J. (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.

Guo, S., and Kemphues, K.J. (1996). A non-muscle myosin required for embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *382*, 455-458.

Gurumurthy, S., Xie, S.Z., Alagesan, B., Kim, J., Yusuf, R.Z., Saez, B., Tzatsos, A., Oszolak, F., Milos, P., Ferrari, F., *et al.* (2010). The *Lkb1* metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. *Nature* *468*, 659-663.

Güven-Ozkan, T., Nishi, Y., Robertson, S.M., and Lin, R. (2008). Global transcriptional repression in *C. elegans* germline precursors by regulated sequestration of TAF-4. *Cell* *135*, 149-160.

Güven-Ozkan, T., Robertson, S.M., Nishi, Y., and Lin, R. (2010). *zif-1* translational repression defines a second, mutually exclusive OMA function in germline transcriptional repression. *Development* *137*, 3373-3382.

- Hagting, A., Karlsson, C., Clute, P., Jackman, M., and Pines, J. (1998). MPF localization is controlled by nuclear export. *The EMBO journal* *17*, 4127-4138.
- Hall, D.H., Winfrey, V.P., Blaeuer, G., Hoffman, L.H., Furuta, T., Rose, K.L., Hobert, O., and Greenstein, D. (1999). Ultrastructural features of the adult hermaphrodite gonad of *Caenorhabditis elegans*: relations between the germ line and soma. *Developmental biology* *212*, 101-123.
- Hamill, D.R., Severson, A.F., Carter, J.C., and Bowerman, B. (2002). Centrosome maturation and mitotic spindle assembly in *C. elegans* require SPD-5, a protein with multiple coiled-coil domains. *Developmental cell* *3*, 673-684.
- Han, H., Tanigaki, K., Yamamoto, N., Kuroda, K., Yoshimoto, M., Nakahata, T., Ikuta, K., and Honjo, T. (2002). Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *International immunology* *14*, 637-645.
- Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A.A., and Oegema, K. (2001). Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology* *155*, 1109-1116.
- Hansen, D., Hubbard, E.J., and Schedl, T. (2004a). Multi-pathway control of the proliferation versus meiotic development decision in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Developmental biology* *268*, 342-357.
- Hansen, D., and Schedl, T. (2006). The regulatory network controlling the proliferation-meiotic entry decision in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Current topics in developmental biology* *76*, 185-215.
- Hansen, D., Wilson-Berry, L., Dang, T., and Schedl, T. (2004b). Control of the proliferation versus meiotic development decision in the *C. elegans* germline through regulation of GLD-1 protein accumulation. *Development* *131*, 93-104.
- Hao, Y., Boyd, L., and Seydoux, G. (2006). Stabilization of cell polarity by the *C. elegans* RING protein PAR-2. *Developmental cell* *10*, 199-208.
- Hardy, R.W., Tokuyasu, K.T., Lindsley, D.L., and Garavito, M. (1979). The germinal proliferation center in the testis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of ultrastructure research* *69*, 180-190.
- Harvey, S.L., Charlet, A., Haas, W., Gygi, S.P., and Kellogg, D.R. (2005). Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1. *Cell* *122*, 407-420.
- Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., Hall, D.H., and Stern, B.D. (1987). Genetics of cell and axon migrations in *Caenorhabditis elegans*. *Development* *100*, 365-382.

Henderson, S.T., Gao, D., Christensen, S., and Kimble, J. (1997). Functional domains of LAG-2, a putative signaling ligand for LIN-12 and GLP-1 receptors in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology of the cell* *8*, 1751-1762.

Henderson, S.T., Gao, D., Lambie, E.J., and Kimble, J. (1994). *lag-2* may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of *C. elegans*. *Development* *120*, 2913-2924.

Henrique, D., Hirsinger, E., Adam, J., Le Roux, I., Pourquie, O., Ish-Horowicz, D., and Lewis, J. (1997). Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Current biology : CB* *7*, 661-670.

Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* *67*, 425-479.

Hill, D.P., and Strome, S. (1988). An analysis of the role of microfilaments in the establishment and maintenance of asymmetry in *Caenorhabditis elegans* zygotes. *Developmental biology* *125*, 75-84.

Hird, S.N., and White, J.G. (1993). Cortical and cytoplasmic flow polarity in early embryonic cells of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology* *121*, 1343-1355.

Hirsh, D., Oppenheim, D., and Klass, M. (1976). Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* *49*, 200-219.

Hoege, C., Constantinescu, A.T., Schwager, A., Goehring, N.W., Kumar, P., and Hyman, A.A. (2010). LGL can partition the cortex of one-cell *Caenorhabditis elegans* embryos into two domains. *Current biology : CB* *20*, 1296-1303.

Hoogewijs, D., Houthoofd, K., Matthijssens, F., Vandesompele, J., and Vanfleteren, J.R. (2008). Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative *sod* gene expression analysis in *C. elegans*. *BMC molecular biology* *9*, 9.

Hubbard, E.J. (2007). *Caenorhabditis elegans* germ line: a model for stem cell biology. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* *236*, 3343-3357.

Hubbard, E.J., and Greenstein, D. (2005). Introduction to the germ line. *WormBook : the online review of C elegans biology*, 1-4.

Hung, T.J., and Kemphues, K.J. (1999). PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* *126*, 127-135.

Hutter, H., and Schnabel, R. (1994). *glp-1* and inductions establishing embryonic axes in *C. elegans*. *Development* *120*, 2051-2064.

Hutterer, A., Berdnik, D., Wirtz-Peitz, F., Zigman, M., Schleiffer, A., and Knoblich, J.A. (2006). Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora. *Developmental cell* *11*, 147-157.

Hyenne, V., Desrosiers, M., and Labbe, J.C. (2008). *C. elegans* Brat homologs regulate PAR protein-dependent polarity and asymmetric cell division. *Developmental biology* *321*, 368-378.

Inaba, M., Venkei, Z.G., and Yamashita, Y.M. (2015). The polarity protein Baz forms a platform for the centrosome orientation during asymmetric stem cell division in the *Drosophila* male germline. *eLife* *4*.

Inoue, D., and Sagata, N. (2005). The Polo-like kinase Plx1 interacts with and inhibits Myt1 after fertilization of *Xenopus* eggs. *The EMBO journal* *24*, 1057-1067.

Ishibashi, M., Moriyoshi, K., Sasai, Y., Shiota, K., Nakanishi, S., and Kageyama, R. (1994). Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *The EMBO journal* *13*, 1799-1805.

Ito, K., and Hotta, Y. (1992). Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology* *149*, 134-148.

Itoh, M., Kim, C.H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y.J., Maust, D., Yeo, S.Y., Lorick, K., Wright, G.J., Ariza-McNaughton, L., *et al.* (2003). Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Developmental cell* *4*, 67-82.

Jafar-Nejad, H., Andrews, H.K., Acar, M., Bayat, V., Wirtz-Peitz, F., Mehta, S.Q., Knoblich, J.A., and Bellen, H.J. (2005). Sec15, a component of the exocyst, promotes notch signaling during the asymmetric division of *Drosophila* sensory organ precursors. *Developmental cell* *9*, 351-363.

Jan, E., Motzny, C.K., Graves, L.E., and Goodwin, E.B. (1999). The STAR protein, GLD-1, is a translational regulator of sexual identity in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal* *18*, 258-269.

Jaramillo-Lambert, A., Ellefson, M., Villeneuve, A.M., and Engebrecht, J. (2007). Differential timing of S phases, X chromosome replication, and meiotic prophase in the *C. elegans* germ line. *Developmental biology* *308*, 206-221.

Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R., and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* *377*, 355-358.

Jarriault, S., and Greenwald, I. (2005). Evidence for functional redundancy between *C. elegans* ADAM proteins SUP-17/Kuzbanian and ADM-4/TACE. *Developmental biology* *287*, 1-10.

Jenkins, P.M., Hurd, T.W., Zhang, L., McEwen, D.P., Brown, R.L., Margolis, B., Verhey, K.J., and Martens, J.R. (2006). Ciliary targeting of olfactory CNG channels requires the CNGB1b subunit and the kinesin-2 motor protein, KIF17. *Current biology : CB* 16, 1211-1216.

Jeong, J., Verheyden, J.M., and Kimble, J. (2011). Cyclin E and Cdk2 control GLD-1, the mitosis/meiosis decision, and germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics* 7, e1001348.

Jin, S.W., Arno, N., Cohen, A., Shah, A., Xu, Q., Chen, N., and Ellis, R.E. (2001). In *Caenorhabditis elegans*, the RNA-binding domains of the cytoplasmic polyadenylation element binding protein FOG-1 are needed to regulate germ cell fates. *Genetics* 159, 1617-1630.

Jin, Z., Kirilly, D., Weng, C., Kawase, E., Song, X., Smith, S., Schwartz, J., and Xie, T. (2008). Differentiation-defective stem cells outcompete normal stem cells for niche occupancy in the *Drosophila* ovary. *Cell stem cell* 2, 39-49.

Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., and Macara, I.G. (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nature cell biology* 2, 531-539.

Jones, A.R., and Schedl, T. (1995). Mutations in *gld-1*, a female germ cell-specific tumor suppressor gene in *Caenorhabditis elegans*, affect a conserved domain also found in Src-associated protein Sam68. *Genes & development* 9, 1491-1504.

Kadyk, L.C., and Kimble, J. (1998). Genetic regulation of entry into meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 125, 1803-1813.

Kageyama, R., and Ohtsuka, T. (1999). The Notch-Hes pathway in mammalian neural development. *Cell research* 9, 179-188.

Kai, T., and Spradling, A. (2004). Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nature* 428, 564-569.

Kalchauer, I., Farley, B.M., Pauli, S., Ryder, S.P., and Ciosk, R. (2011). FBF represses the Cip/Kip cell-cycle inhibitor CKI-2 to promote self-renewal of germline stem cells in *C. elegans*. *The EMBO journal* 30, 3823-3829.

Kalogeropoulos, N., Christoforou, C., Green, A.J., Gill, S., and Ashcroft, N.R. (2004). *chk-1* is an essential gene and is required for an S-M checkpoint during early embryogenesis. *Cell cycle* 3, 1196-1200.

Kaltschmidt, J.A., Davidson, C.M., Brown, N.H., and Brand, A.H. (2000). Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. *Nature cell biology* 2, 7-12.

Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., *et al.* (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* *421*, 231-237.

Kawamata, S., Du, C., Li, K., and Lavau, C. (2002). Overexpression of the Notch target genes *Hes* in vivo induces lymphoid and myeloid alterations. *Oncogene* *21*, 3855-3863.

Kawano, T., Zheng, H., Merz, D.C., Kohara, Y., Tamai, K.K., Nishiwaki, K., and Culotti, J.G. (2009). *C. elegans* mig-6 encodes papilin isoforms that affect distinct aspects of DTC migration, and interacts genetically with mig-17 and collagen IV. *Development* *136*, 1433-1442.

Kay, A.J., and Hunter, C.P. (2001). CDC-42 regulates PAR protein localization and function to control cellular and embryonic polarity in *C. elegans*. *Current biology* : CB *11*, 474-481.

Kemphues, K.J., Priess, J.R., Morton, D.G., and Cheng, N.S. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* *52*, 311-320.

Kemphues, K.J., and Strome, S. (1997). Fertilization and Establishment of Polarity in the Embryo. In *C. elegans II*, D.L. Riddle, T. Blumenthal, B.J. Meyer, and J.R. Priess, eds. (Cold Spring Harbor (NY)).

Kershner, A.M., and Kimble, J. (2010). Genome-wide analysis of mRNA targets for *Caenorhabditis elegans* FBF, a conserved stem cell regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 3936-3941.

Kershner, A.M., Shin, H., Hansen, T.J., and Kimble, J. (2014). Discovery of two GLP-1/Notch target genes that account for the role of GLP-1/Notch signaling in stem cell maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 3739-3744.

Keyomarsi, K., and Herliczek, T.W. (1997). The role of cyclin E in cell proliferation, development and cancer. *Progress in cell cycle research* *3*, 171-191.

Kidd, A.R., 3rd, Miskowski, J.A., Siegfried, K.R., Sawa, H., and Kimble, J. (2005). A beta-catenin identified by functional rather than sequence criteria and its role in Wnt/MAPK signaling. *Cell* *121*, 761-772.

Kiger, A.A., Jones, D.L., Schulz, C., Rogers, M.B., and Fuller, M.T. (2001). Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science* *294*, 2542-2545.

Kikuchi, T., Shibata, Y., Kim, H.S., Kubota, Y., Yoshina, S., Mitani, S., and Nishiwaki, K. (2015). The BED finger domain protein MIG-39 halts migration of distal tip cells in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* *397*, 151-161.

- Killian, D.J., and Hubbard, E.J. (2005). *Caenorhabditis elegans* germline patterning requires coordinated development of the somatic gonadal sheath and the germ line. *Developmental biology* 279, 322-335.
- Kimble, J., and Crittenden, S.L. (2005). Germline proliferation and its control. *WormBook : the online review of C elegans biology*, 1-14.
- Kimble, J., and Hirsh, D. (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 70, 396-417.
- Kimble J, W.S. (1988). *Germ-line development and fertilization*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kimble, J.E., and White, J.G. (1981). On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 81, 208-219.
- King, R.W., Peters, J.M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P., and Kirschner, M.W. (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 81, 279-288.
- Kipreos, E.T., Gohel, S.P., and Hedgecock, E.M. (2000). The *C. elegans* F-box/WD-repeat protein LIN-23 functions to limit cell division during development. *Development* 127, 5071-5082.
- Kipreos, E.T., Lander, L.E., Wing, J.P., He, W.W., and Hedgecock, E.M. (1996). *cul-1* is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family. *Cell* 85, 829-839.
- Kirilly, D., Wang, S., and Xie, T. (2011). Self-maintained escort cells form a germline stem cell differentiation niche. *Development* 138, 5087-5097.
- Knoblich, J.A., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1995). Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. *Nature* 377, 624-627.
- Knoblich, J.A., and Lehner, C.F. (1993). Synergistic action of *Drosophila* cyclins A and B during the G2-M transition. *The EMBO journal* 12, 65-74.
- Knoblich, J.A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R., and Lehner, C.F. (1994). Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* 77, 107-120.
- Knust, E., and Campos-Ortega, J.A. (1989). The molecular genetics of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 11, 95-100.

- Kodoyianni, V., Maine, E.M., and Kimble, J. (1992). Molecular basis of loss-of-function mutations in the *glp-1* gene of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology of the cell* *3*, 1199-1213.
- Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., and Matsuzaki, F. (2008). Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nature cell biology* *10*, 93-101.
- Korta, D.Z., and Hubbard, E.J. (2010). Soma-germline interactions that influence germline proliferation in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* *239*, 1449-1459.
- Korta, D.Z., Tuck, S., and Hubbard, E.J. (2012). S6K links cell fate, cell cycle and nutrient response in *C. elegans* germline stem/progenitor cells. *Development* *139*, 859-870.
- Kostic, I., Li, S., and Roy, R. (2003). *kci-1* links cell division and cell fate acquisition in the *C. elegans* somatic gonad. *Developmental biology* *263*, 242-252.
- Kotak, S., Busso, C., and Gönczy, P. (2012). Cortical dynein is critical for proper spindle positioning in human cells. *The Journal of cell biology* *199*, 97-110.
- Kovacevic, I., Ho, R., and Cram, E.J. (2012). *CCDC-55* is required for larval development and distal tip cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of development* *128*, 548-559.
- Kraemer, B., Crittenden, S., Gallegos, M., Moulder, G., Barstead, R., Kimble, J., and Wickens, M. (1999). *NANOS-3* and *FBF* proteins physically interact to control the spermatocyte switch in *Caenorhabditis elegans*. *Current biology : CB* *9*, 1009-1018.
- Krahn, M.P., Klopfenstein, D.R., Fischer, N., and Wodarz, A. (2010). Membrane targeting of *Bazooka/Par-3* is mediated by direct binding to phosphoinositide lipids. *Current biology : CB* *20*, 636-642.
- Krueger, L.E., Wu, J.C., Tsou, M.F., and Rose, L.S. (2010). *LET-99* inhibits lateral posterior pulling forces during asymmetric spindle elongation in *C. elegans* embryos. *The Journal of cell biology* *189*, 481-495.
- Kuchinke, U., Grawe, F., and Knust, E. (1998). Control of spindle orientation in *Drosophila* by the *Par-3*-related PDZ-domain protein *Bazooka*. *Current biology : CB* *8*, 1357-1365.
- Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (1996). Purification and molecular cloning of *Plx1*, a *Cdc25*-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science* *273*, 1377-1380.
- Kuwabara, P.E., and Kimble, J. (1995). A predicted membrane protein, *TRA-2A*, directs hermaphrodite development in *Caenorhabditis elegans*. *Development* *121*, 2995-3004.

- Kuwabara, P.E., Okkema, P.G., and Kimble, J. (1992). *tra-2* encodes a membrane protein and may mediate cell communication in the *Caenorhabditis elegans* sex determination pathway. *Molecular biology of the cell* *3*, 461-473.
- Labbe, J.C., McCarthy, E.K., and Goldstein, B. (2004). The forces that position a mitotic spindle asymmetrically are tethered until after the time of spindle assembly. *The Journal of cell biology* *167*, 245-256.
- Labbé, J.C., Pacquelet, A., Marty, T., and 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.
- Lacroix, B., Bourdages, K.G., Dorn, J.F., Ihara, S., Sherwood, D.R., Maddox, P.S., and Maddox, A.S. (2014). In situ imaging in *C. elegans* reveals developmental regulation of microtubule dynamics. *Developmental cell* *29*, 203-216.
- Lai, E.C., Deblandre, G.A., Kintner, C., and Rubin, G.M. (2001). *Drosophila* neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of delta. *Developmental cell* *1*, 783-794.
- Lam, N., Chesney, M.A., and Kimble, J. (2006). Wnt signaling and CEH-22/tinman/Nkx2.5 specify a stem cell niche in *C. elegans*. *Current biology : CB* *16*, 287-295.
- Lambie, E.J., and Kimble, J. (1991). Two homologous regulatory genes, *lin-12* and *glp-1*, have overlapping functions. *Development* *112*, 231-240.
- Lamont, L.B., Crittenden, S.L., Bernstein, D., Wickens, M., and Kimble, J. (2004). FBF-1 and FBF-2 regulate the size of the mitotic region in the *C. elegans* germline. *Developmental cell* *7*, 697-707.
- Leatherman, J.L., and Dinardo, S. (2010). Germline self-renewal requires cyst stem cells and stat regulates niche adhesion in *Drosophila* testes. *Nature cell biology* *12*, 806-811.
- Lee, C.Y., Andersen, R.O., Cabernard, C., Manning, L., Tran, K.D., Lanskey, M.J., Bashirullah, A., and Doe, C.Q. (2006a). *Drosophila* Aurora-A kinase inhibits neuroblast self-renewal by regulating aPKC/Numb cortical polarity and spindle orientation. *Genes & development* *20*, 3464-3474.
- Lee, C.Y., Robinson, K.J., and Doe, C.Q. (2006b). Lgl, Pins and aPKC regulate neuroblast self-renewal versus differentiation. *Nature* *439*, 594-598.
- Lee, M., Cram, E.J., Shen, B., and Schwarzbauer, J.E. (2001). Roles for beta(*pat-3*) integrins in development and function of *Caenorhabditis elegans* muscles and gonads. *The Journal of biological chemistry* *276*, 36404-36410.

Lee, M.H., Hook, B., Lamont, L.B., Wickens, M., and Kimble, J. (2006c). LIP-1 phosphatase controls the extent of germline proliferation in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal* *25*, 88-96.

Lee, M.H., and Schedl, T. (2001). Identification of in vivo mRNA targets of GLD-1, a maxi-KH motif containing protein required for *C. elegans* germ cell development. *Genes & development* *15*, 2408-2420.

Lee, M.H., and Schedl, T. (2010). *C. elegans* star proteins, GLD-1 and ASD-2, regulate specific RNA targets to control development. *Advances in experimental medicine and biology* *693*, 106-122.

Lehner, C.F., and O'Farrell, P.H. (1990). The roles of *Drosophila* cyclins A and B in mitotic control. *Cell* *61*, 535-547.

Leidel, S., Delattre, M., Cerutti, L., Baumer, K., and Gönczy, P. (2005). SAS-6 defines a protein family required for centrosome duplication in *C. elegans* and in human cells. *Nature cell biology* *7*, 115-125.

Leung-Hagesteijn, C., Spence, A.M., Stern, B.D., Zhou, Y., Su, M.W., Hedgecock, E.M., and Culotti, J.G. (1992). UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* *71*, 289-299.

Levitan, D., and Greenwald, I. (1995). Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature* *377*, 351-354.

Levitan, D.J., Boyd, L., Mello, C.C., Kemphues, K.J., and Stinchcomb, D.T. (1994). par-2, a gene required for blastomere asymmetry in *Caenorhabditis elegans*, encodes zinc-finger and ATP-binding motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 6108-6112.

Li, B., Kim, H., Beers, M., and Kemphues, K. (2010a). Different domains of *C. elegans* PAR-3 are required at different times in development. *Developmental biology* *344*, 745-757.

Li, J., Kim, H., Aceto, D.G., Hung, J., Aono, S., and Kemphues, K.J. (2010b). Binding to PKC-3, but not to PAR-3 or to a conventional PDZ domain ligand, is required for PAR-6 function in *C. elegans*. *Developmental biology* *340*, 88-98.

Li, L., and Clevers, H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* *327*, 542-545.

Li, X., and Greenwald, I. (1997). HOP-1, a *Caenorhabditis elegans* presenilin, appears to be functionally redundant with SEL-12 presenilin and to facilitate LIN-12 and GLP-1 signaling.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *94*, 12204-12209.

Li, X., Johnson, R.W., Park, D., Chin-Sang, I., and Chamberlin, H.M. (2012). Somatic gonad sheath cells and Eph receptor signaling promote germ-cell death in *C. elegans*. *Cell death and differentiation* *19*, 1080-1089.

Lim, J.G., and Fuller, M.T. (2012). Somatic cell lineage is required for differentiation and not maintenance of germline stem cells in *Drosophila* testes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 18477-18481.

Lin, D., Edwards, A.S., Fawcett, J.P., Mbamalu, G., Scott, J.D., and Pawson, T. (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nature cell biology* *2*, 540-547.

Lin, H., and Spradling, A.C. (1997). A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* *124*, 2463-2476.

Lin, R. (2003). A gain-of-function mutation in *oma-1*, a *C. elegans* gene required for oocyte maturation, results in delayed degradation of maternal proteins and embryonic lethality. *Developmental biology* *258*, 226-239.

Liu, J., Vasudevan, S., and Kipreos, E.T. (2004). CUL-2 and ZYG-11 promote meiotic anaphase II and the proper placement of the anterior-posterior axis in *C. elegans*. *Development* *131*, 3513-3525.

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., *et al.* (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *The EMBO journal* *23*, 833-843.

Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., and Israel, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 8108-8112.

Lucanic, M., and Cheng, H.J. (2008). A RAC/CDC-42-independent GIT/PIX/PAK signaling pathway mediates cell migration in *C. elegans*. *PLoS genetics* *4*, e1000269.

Lundin, V.F., Srayko, M., Hyman, A.A., and Leroux, M.R. (2008). Efficient chaperone-mediated tubulin biogenesis is essential for cell division and cell migration in *C. elegans*. *Developmental biology* *313*, 320-334.

Macara, I.G., and McCaffrey, L. (2013). Cell polarity in morphogenesis and metastasis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* *368*, 20130012.

- Maciejowski, J., Ugel, N., Mishra, B., Isopi, M., and Hubbard, E.J. (2006). Quantitative analysis of germline mitosis in adult *C. elegans*. *Developmental biology* 292, 142-151.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews Cancer* 9, 153-166.
- Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P., and Barbacid, M. (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118, 493-504.
- Mango, S.E., Thorpe, C.J., Martin, P.R., Chamberlain, S.H., and Bowerman, B. (1994). Two maternal genes, *apx-1* and *pie-1*, are required to distinguish the fates of equivalent blastomeres in the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Development* 120, 2305-2315.
- Mao, J.H., Wu, D., Perez-Losada, J., Jiang, T., Li, Q., Neve, R.M., Gray, J.W., Cai, W.W., and Balmain, A. (2007). Crosstalk between Aurora-A and p53: frequent deletion or downregulation of Aurora-A in tumors from p53 null mice. *Cancer cell* 11, 161-173.
- Marin, V.A., and Evans, T.C. (2003). Translational repression of a *C. elegans* Notch mRNA by the STAR/KH domain protein GLD-1. *Development* 130, 2623-2632.
- Martin-Belmonte, F., Gassama, A., Datta, A., Yu, W., Rescher, U., Gerke, V., and Mostov, K. (2007). PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell* 128, 383-397.
- Martin, J., Hunt, S.L., Dubus, P., Sotillo, R., Nehme-Pelluard, F., Magnuson, M.A., Parlow, A.F., Malumbres, M., Ortega, S., and Barbacid, M. (2003). Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic beta-cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene* 22, 5261-5269.
- Mayer, M., Depken, M., Bois, J.S., Julicher, F., and Grill, S.W. (2010). Anisotropies in cortical tension reveal the physical basis of polarizing cortical flows. *Nature* 467, 617-621.
- McCaffrey, L.M., Montalbano, J., Mihai, C., and Macara, I.G. (2012). Loss of the Par3 polarity protein promotes breast tumorigenesis and metastasis. *Cancer cell* 22, 601-614.
- McCarter, J., Bartlett, B., Dang, T., and Schedl, T. (1997). Soma-germ cell interactions in *Caenorhabditis elegans*: multiple events of hermaphrodite germline development require the somatic sheath and spermathecal lineages. *Developmental biology* 181, 121-143.
- McCarthy Campbell, E.K., Werts, A.D., and Goldstein, B. (2009). A cell cycle timer for asymmetric spindle positioning. *PLoS biology* 7, e1000088.

- McCusker, D., Denison, C., Anderson, S., Egelhofer, T.A., Yates, J.R., 3rd, Gygi, S.P., and Kellogg, D.R. (2007). Cdk1 coordinates cell-surface growth with the cell cycle. *Nature cell biology* 9, 506-515.
- McGovern, M., Voutev, R., Maciejowski, J., Corsi, A.K., and Hubbard, E.J. (2009). A "latent niche" mechanism for tumor initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 11617-11622.
- McNally, K.L., and McNally, F.J. (2005). Fertilization initiates the transition from anaphase I to metaphase II during female meiosis in *C. elegans*. *Developmental biology* 282, 218-230.
- Meighan, C.M., and Schwarzbauer, J.E. (2007). Control of *C. elegans* hermaphrodite gonad size and shape by *vab-3/Pax6*-mediated regulation of integrin receptors. *Genes & development* 21, 1615-1620.
- Meister, P., Taddei, A., Ponti, A., Baldacci, G., and Gasser, S.M. (2007). Replication foci dynamics: replication patterns are modulated by S-phase checkpoint kinases in fission yeast. *The EMBO journal* 26, 1315-1326.
- Mello, C.C., Draper, B.W., and Priess, J.R. (1994). The maternal genes *apx-1* and *glp-1* and establishment of dorsal-ventral polarity in the early *C. elegans* embryo. *Cell* 77, 95-106.
- Mello, C.C., Schubert, C., Draper, B., Zhang, W., Lobel, R., and Priess, J.R. (1996). The PIE-1 protein and germline specification in *C. elegans* embryos. *Nature* 382, 710-712.
- Meloty-Kapella, L., Shergill, B., Kuon, J., Botvinick, E., and Weinmaster, G. (2012). Notch ligand endocytosis generates mechanical pulling force dependent on dynamin, epsins, and actin. *Developmental cell* 22, 1299-1312.
- Merritt, C., and Seydoux, G. (2010). The Puf RNA-binding proteins FBF-1 and FBF-2 inhibit the expression of synaptonemal complex proteins in germline stem cells. *Development* 137, 1787-1798.
- Merz, D.C., Zheng, H., Killeen, M.T., Krizus, A., and Culotti, J.G. (2001). Multiple signaling mechanisms of the UNC-6/netrin receptors UNC-5 and UNC-40/DCC in vivo. *Genetics* 158, 1071-1080.
- Michaelson, D., Korta, D.Z., Capua, Y., and Hubbard, E.J. (2010). Insulin signaling promotes germline proliferation in *C. elegans*. *Development* 137, 671-680.
- Mickey, K.M., Mello, C.C., Montgomery, M.K., Fire, A., and Priess, J.R. (1996). An inductive interaction in 4-cell stage *C. elegans* embryos involves APX-1 expression in the signalling cell. *Development* 122, 1791-1798.

- Moons, D.S., Jirawatnotai, S., Parlow, A.F., Gibori, G., Kineman, R.D., and Kiyokawa, H. (2002). Pituitary hypoplasia and lactotroph dysfunction in mice deficient for cyclin-dependent kinase-4. *Endocrinology* *143*, 3001-3008.
- Moore, R., and Boyd, L. (2004). Analysis of RING finger genes required for embryogenesis in *C. elegans*. *Genesis* *38*, 1-12.
- Morgan, C.T., Noble, D., and Kimble, J. (2013). Mitosis-meiosis and sperm-oocyte fate decisions are separable regulatory events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 3411-3416.
- Morgan, D.E., Crittenden, S.L., and Kimble, J. (2010). The *C. elegans* adult male germline: stem cells and sexual dimorphism. *Developmental biology* *346*, 204-214.
- Morgan, D.O. (2007). *The Cell Cycle: Principles of Control*. London: New Science Press Ltd.
- Morgan, T. (1917). The theory of the gene. . *The American Naturalist* *51*, 513–544
- Morris, L.X., and Spradling, A.C. (2011). Long-term live imaging provides new insight into stem cell regulation and germline-soma coordination in the *Drosophila* ovary. *Development* *138*, 2207-2215.
- Morrison, S.J., and Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* *441*, 1068-1074.
- Morton, D.G., Shakes, D.C., Nugent, S., Dichoso, D., Wang, W., Golden, A., and Kemphues, K.J. (2002). The *Caenorhabditis elegans* par-5 gene encodes a 14-3-3 protein required for cellular asymmetry in the early embryo. *Developmental biology* *241*, 47-58.
- Moskowitz, I.P., Gendreau, S.B., and Rothman, J.H. (1994). Combinatorial specification of blastomere identity by glp-1-dependent cellular interactions in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Development* *120*, 3325-3338.
- Motegi, F., and Seydoux, G. (2007). Revisiting the role of microtubules in *C. elegans* polarity. *The Journal of cell biology* *179*, 367-369.
- Motegi, F., and Seydoux, G. (2013). The PAR network: redundancy and robustness in a symmetry-breaking system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*.
- Motegi, F., and Sugimoto, A. (2006). Sequential functioning of the ECT-2 RhoGEF, RHO-1 and CDC-42 establishes cell polarity in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nature cell biology* *8*, 978-985.

- Motegi, F., Zonies, S., Hao, Y., Cuenca, A.A., Griffin, E., and Seydoux, G. (2011). Microtubules induce self-organization of polarized PAR domains in *Caenorhabditis elegans* zygotes. *Nature cell biology* *13*, 1361-1367.
- Mueller, P.R., Coleman, T.R., and Dunphy, W.G. (1995). Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase. *Molecular biology of the cell* *6*, 119-134.
- Munro, E., Nance, J., and 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. *Developmental cell* *7*, 413-424.
- Murata, A., Yoshino, M., Hikosaka, M., Okuyama, K., Zhou, L., Sakano, S., Yagita, H., and Hayashi, S. (2014). An evolutionary-conserved function of mammalian notch family members as cell adhesion molecules. *PloS one* *9*, e108535.
- Murray, A.W., Solomon, M.J., and Kirschner, M.W. (1989). The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* *339*, 280-286.
- Nadarajan, S., Govindan, J.A., McGovern, M., Hubbard, E.J., and Greenstein, D. (2009). MSP and GLP-1/Notch signaling coordinately regulate actomyosin-dependent cytoplasmic streaming and oocyte growth in *C. elegans*. *Development* *136*, 2223-2234.
- Nakada, D., Saunders, T.L., and Morrison, S.J. (2010). Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature* *468*, 653-658.
- Narayan, N., Massimi, P., and Banks, L. (2009). CDK phosphorylation of the discs large tumour suppressor controls its localisation and stability. *Journal of cell science* *122*, 65-74.
- Neumuller, R.A., and Knoblich, J.A. (2009). Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes & development* *23*, 2675-2699.
- Newton, A.C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chemical reviews* *101*, 2353-2364.
- Nguyen-Ngoc, T., Afshar, K., and Gönczy, P. (2007). Coupling of cortical dynein and G alpha proteins mediates spindle positioning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature cell biology* *9*, 1294-1302.
- Nichols, J.T., Miyamoto, A., Olsen, S.L., D'Souza, B., Yao, C., and Weinmaster, G. (2007). DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *The Journal of cell biology* *176*, 445-458.
- Nishi, Y., Rogers, E., Robertson, S.M., and Lin, R. (2008). Polo kinases regulate *C. elegans* embryonic polarity via binding to DYRK2-primed MEX-5 and MEX-6. *Development* *135*, 687-697.

- Nishimura, T., Kato, K., Yamaguchi, T., Fukata, Y., Ohno, S., and Kaibuchi, K. (2004). Role of the PAR-3-KIF3 complex in the establishment of neuronal polarity. *Nature cell biology* 6, 328-334.
- Nishiwaki, K. (1999). Mutations affecting symmetrical migration of distal tip cells in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 152, 985-997.
- Noatynska, A., Panbianco, C., and Gotta, M. (2010). SPAT-1/Bora acts with Polo-like kinase 1 to regulate PAR polarity and cell cycle progression. *Development* 137, 3315-3325.
- Noatynska, A., Tavernier, N., Gotta, M., and Pintard, L. (2013). Coordinating cell polarity and cell cycle progression: what can we learn from flies and worms? *Open biology* 3, 130083.
- Nurse, P., Thuriaux, P., and Nasmyth, K. (1976). Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular & general genetics : MGG* 146, 167-178.
- O'Connell, K.F., Maxwell, K.N., and White, J.G. (2000). The *spd-2* gene is required for polarization of the anteroposterior axis and formation of the sperm asters in the *Caenorhabditis elegans* zygote. *Developmental biology* 222, 55-70.
- Ohtsuka, T., Sakamoto, M., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2001). Roles of the basic helix-loop-helix genes *Hes1* and *Hes5* in expansion of neural stem cells of the developing brain. *The Journal of biological chemistry* 276, 30467-30474.
- Okkema, P.G., and Kimble, J. (1991). Molecular analysis of *tra-2*, a sex determining gene in *C.elegans*. *The EMBO journal* 10, 171-176.
- Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martin, A., Dubus, P., Sotillo, R., Barbero, J.L., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nature genetics* 35, 25-31.
- Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K., and Maekawa, M. (2008). Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem cells* 26, 1663-1672.
- Pacquelet, A., Zanin, E., Ashiono, C., and Gotta, M. (2008). PAR-6 levels are regulated by NOS-3 in a CUL-2 dependent manner in *Caenorhabditiselegans*. *Developmental biology* 319, 267-272.
- Palomero, T., Lim, W.K., Odom, D.T., Sulis, M.L., Real, P.J., Margolin, A., Barnes, K.C., O'Neil, J., Neuberg, D., Weng, A.P., *et al.* (2006). NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18261-18266.

- Pan, L., Chen, S., Weng, C., Call, G., Zhu, D., Tang, H., Zhang, N., and Xie, T. (2007). Stem cell aging is controlled both intrinsically and extrinsically in the *Drosophila* ovary. *Cell stem cell* 1, 458-469.
- Park, D.H., and Rose, L.S. (2008). Dynamic localization of LIN-5 and GPR-1/2 to cortical force generation domains during spindle positioning. *Developmental biology* 315, 42-54.
- Park, M., and Krause, M.W. (1999). Regulation of postembryonic G(1) cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans* by a cyclin D/CDK-like complex. *Development* 126, 4849-4860.
- Parker, S.S., Mandell, E.K., Hapak, S.M., Maskaykina, I.Y., Kusne, Y., Kim, J.Y., Moy, J.K., St John, P.A., Wilson, J.M., Gothard, K.M., *et al.* (2013). Competing molecular interactions of aPKC isoforms regulate neuronal polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 14450-14455.
- Parks, A.L., Klueg, K.M., Stout, J.R., and Muskavitch, M.A. (2000). Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127, 1373-1385.
- Passmore, L.A., and Barford, D. (2004). Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *The Biochemical journal* 379, 513-525.
- Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K.M., Muskavitch, M.A., Moschonas, N.K., and Delidakis, C. (2001). *neuralized* Encodes a peripheral membrane protein involved in delta signaling and endocytosis. *Developmental cell* 1, 807-816.
- Pelletier, L., O'Toole, E., Schwager, A., Hyman, A.A., and Muller-Reichert, T. (2006). Centriole assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 444, 619-623.
- Pelletier, L., Ozlu, N., Hannak, E., Cowan, C., Habermann, B., Ruer, M., Muller-Reichert, T., and Hyman, A.A. (2004). The *Caenorhabditis elegans* centrosomal protein SPD-2 is required for both pericentriolar material recruitment and centriole duplication. *Current biology : CB* 14, 863-873.
- Pepper, A.S., Killian, D.J., and Hubbard, E.J. (2003a). Genetic analysis of *Caenorhabditis elegans* *glp-1* mutants suggests receptor interaction or competition. *Genetics* 163, 115-132.
- Pepper, A.S., Lo, T.W., Killian, D.J., Hall, D.H., and Hubbard, E.J. (2003b). The establishment of *Caenorhabditis elegans* germline pattern is controlled by overlapping proximal and distal somatic gonad signals. *Developmental biology* 259, 336-350.
- Perry, M.D., Li, W., Trent, C., Robertson, B., Fire, A., Hageman, J.M., and Wood, W.B. (1993). Molecular characterization of the *her-1* gene suggests a direct role in cell signaling during *Caenorhabditis elegans* sex determination. *Genes & development* 7, 216-228.

- Petcherski, A.G., and Kimble, J. (2000a). LAG-3 is a putative transcriptional activator in the *C. elegans* Notch pathway. *Nature* *405*, 364-368.
- Petcherski, A.G., and Kimble, J. (2000b). Mastermind is a putative activator for Notch. *Current biology : CB* *10*, R471-473.
- Petronczki, M., and Knoblich, J.A. (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nature cell biology* *3*, 43-49.
- Petroski, M.D., and Deshaies, R.J. (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature reviews Molecular cell biology* *6*, 9-20.
- Phillips, B.T., Kidd, A.R., 3rd, King, R., Hardin, J., and Kimble, J. (2007). Reciprocal asymmetry of SYS-1/beta-catenin and POP-1/TCF controls asymmetric divisions in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 3231-3236.
- Pickart, C.M. (2000). Ubiquitin in chains. *Trends in biochemical sciences* *25*, 544-548.
- Poulson, D.F. (1937). Chromosomal Deficiencies and the Embryonic Development of *Drosophila Melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *23*, 133-137.
- Prehoda, K.E. (2009). Polarization of *Drosophila* neuroblasts during asymmetric division. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *1*, a001388.
- Priess, J.R., Schnabel, H., and Schnabel, R. (1987). The *glp-1* locus and cellular interactions in early *C. elegans* embryos. *Cell* *51*, 601-611.
- Quinn, J.C., Molinek, M., Martynoga, B.S., Zaki, P.A., Faedo, A., Bulfone, A., Hevner, R.F., West, J.D., and Price, D.J. (2007). Pax6 controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the cell cycle and specifies cortical cell identity by a cell autonomous mechanism. *Developmental biology* *302*, 50-65.
- Rabilotta, A., Desrosiers, M., and Labbe, J.C. (2015). CDK-1 and two B-type cyclins promote PAR-6 stabilization during polarization of the early *C. elegans* embryo. *PloS one* *10*, e0117656.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* *10*, 547-558.
- Raleigh, J.M., and O'Connell, M.J. (2000). The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *Journal of cell science* *113 (Pt 10)*, 1727-1736.

Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J.C., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P., *et al.* (2001). Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *The EMBO journal* *20*, 3427-3436.

Rappleye, C.A., Tagawa, A., Lyczak, R., Bowerman, B., and Aroian, R.V. (2002). The anaphase-promoting complex and separin are required for embryonic anterior-posterior axis formation. *Developmental cell* *2*, 195-206.

Rebay, I., Fleming, R.J., Fehon, R.G., Cherbas, L., Cherbas, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* *67*, 687-699.

Reddien, P.W., and Horvitz, H.R. (2000). CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature cell biology* *2*, 131-136.

Reese, K.J., Dunn, M.A., Waddle, J.A., and Seydoux, G. (2000). Asymmetric segregation of PIE-1 in *C. elegans* is mediated by two complementary mechanisms that act through separate PIE-1 protein domains. *Molecular cell* *6*, 445-455.

Renaud, O., and Simpson, P. (2001). *scabrous* modifies epithelial cell adhesion and extends the range of lateral signalling during development of the spaced bristle pattern in *Drosophila*. *Developmental biology* *240*, 361-376.

Rhind, N., and Russell, P. (2000). Chk1 and Cds1: linchpins of the DNA damage and replication checkpoint pathways. *Journal of cell science* *113 (Pt 22)*, 3889-3896.

Rhyu, M.S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1994). Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* *76*, 477-491.

Rivers, D.M., Moreno, S., Abraham, M., and Ahringer, J. (2008). PAR proteins direct asymmetry of the cell cycle regulators Polo-like kinase and Cdc25. *The Journal of cell biology* *180*, 877-885.

Roegiers, F., Younger-Shepherd, S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2001). Two types of asymmetric divisions in the *Drosophila* sensory organ precursor cell lineage. *Nature cell biology* *3*, 58-67.

Rojas-Rios, P., and Gonzalez-Reyes, A. (2014). Concise review: The plasticity of stem cell niches: a general property behind tissue homeostasis and repair. *Stem cells* *32*, 852-859.

Rojas-Rios, P., Guerrero, I., and Gonzalez-Reyes, A. (2012). Cytoneme-mediated delivery of hedgehog regulates the expression of bone morphogenetic proteins to maintain germline stem cells in *Drosophila*. *PLoS biology* *10*, e1001298.

- Ronchini, C., and Capobianco, A.J. (2001). Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Mol Cell Biol* 21, 5925-5934.
- Rose, K.L., Winfrey, V.P., Hoffman, L.H., Hall, D.H., Furuta, T., and Greenstein, D. (1997). The POU gene *ceh-18* promotes gonadal sheath cell differentiation and function required for meiotic maturation and ovulation in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 192, 59-77.
- Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 196, 801-810.
- Roy, S., Huang, H., Liu, S., and Kornberg, T.B. (2014). Cytoskeleton-mediated contact-dependent transport of the *Drosophila* decapentaplegic signaling protein. *Science* 343, 1244624.
- Russell, P., and Nurse, P. (1986). *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 45, 145-153.
- Russell, P., and Nurse, P. (1987). Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* 49, 559-567.
- Sadler, P.L., and Shakes, D.C. (2000). Anucleate *Caenorhabditis elegans* sperm can crawl, fertilize oocytes and direct anterior-posterior polarization of the 1-cell embryo. *Development* 127, 355-366.
- Sakamoto, M., Hirata, H., Ohtsuka, T., Bessho, Y., and Kageyama, R. (2003). The basic helix-loop-helix genes *Hesr1/Hey1* and *Hesr2/Hey2* regulate maintenance of neural precursor cells in the brain. *The Journal of biological chemistry* 278, 44808-44815.
- Sanchez-Irizarry, C., Carpenter, A.C., Weng, A.P., Pear, W.S., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2004). Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. *Molecular and cellular biology* 24, 9265-9273.
- Sandie, R., Palidwor, G.A., Huska, M.R., Porter, C.J., Krzyzanowski, P.M., Muro, E.M., Perez-Iratxeta, C., and Andrade-Navarro, M.A. (2009). Recent developments in StemBase: a tool to study gene expression in human and murine stem cells. *BMC research notes* 2, 39.
- Santamaria, D., Barriere, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Caceres, J.F., Dubus, P., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2007). *Cdk1* is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448, 811-815.

Schmid, M., Kuchler, B., and Eckmann, C.R. (2009). Two conserved regulatory cytoplasmic poly(A) polymerases, GLD-4 and GLD-2, regulate meiotic progression in *C. elegans*. *Genes & development* *23*, 824-836.

Schmutz, C., Stevens, J., and Spang, A. (2007). Functions of the novel RhoGAP proteins RGA-3 and RGA-4 in the germ line and in the early embryo of *C. elegans*. *Development* *134*, 3495-3505.

Schober, M., Schaefer, M., and Knoblich, J.A. (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* *402*, 548-551.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells* *4*, 7-25.

Schonegg, S., Constantinescu, A.T., Hoege, C., and Hyman, A.A. (2007). 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 14976-14981.

Schonegg, S., and Hyman, A.A. (2006). CDC-42 and RHO-1 coordinate acto-myosin contractility and PAR protein localization during polarity establishment in *C. elegans* embryos. *Development* *133*, 3507-3516.

Schubert, C.M., Lin, R., de Vries, C.J., Plasterk, R.H., and Priess, J.R. (2000). MEX-5 and MEX-6 function to establish soma/germline asymmetry in early *C. elegans* embryos. *Molecular cell* *5*, 671-682.

Schumacher, J.M., Ashcroft, N., Donovan, P.J., and Golden, A. (1998). A highly conserved centrosomal kinase, AIR-1, is required for accurate cell cycle progression and segregation of developmental factors in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* *125*, 4391-4402.

Schweisguth, F., and Posakony, J.W. (1992). Suppressor of Hairless, the *Drosophila* homolog of the mouse recombination signal-binding protein gene, controls sensory organ cell fates. *Cell* *69*, 1199-1212.

Seki, A., Coppinger, J.A., Jang, C.Y., Yates, J.R., and Fang, G. (2008). Bora and the kinase Aurora cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* *320*, 1655-1658.

Seugnet, L., Simpson, P., and Haenlin, M. (1997). Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Developmental biology* *192*, 585-598.

Severson, A.F., and Bowerman, B. (2003). Myosin and the PAR proteins polarize microfilament-dependent forces that shape and position mitotic spindles in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology* *161*, 21-26.

- Seydoux, G., and Dunn, M.A. (1997). Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Development* *124*, 2191-2201.
- Seydoux, G., and Fire, A. (1994). Soma-germline asymmetry in the distributions of embryonic RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Development* *120*, 2823-2834.
- Seydoux, G., and Greenwald, I. (1989). Cell autonomy of *lin-12* function in a cell fate decision in *C. elegans*. *Cell* *57*, 1237-1245.
- Seydoux, G., Mello, C.C., Pettitt, J., Wood, W.B., Priess, J.R., and Fire, A. (1996). Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. *Nature* *382*, 713-716.
- Seydoux, G., Schedl, T., and Greenwald, I. (1990). Cell-cell interactions prevent a potential inductive interaction between soma and germline in *C. elegans*. *Cell* *61*, 939-951.
- Shakes, D.C., Sadler, P.L., Schumacher, J.M., Abdolrasulnia, M., and Golden, A. (2003). Developmental defects observed in hypomorphic anaphase-promoting complex mutants are linked to cell cycle abnormalities. *Development* *130*, 1605-1620.
- Shelton, C.A., Carter, J.C., Ellis, G.C., and Bowerman, B. (1999). The nonmuscle myosin regulatory light chain gene *mlc-4* is required for cytokinesis, anterior-posterior polarity, and body morphology during *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *The Journal of cell biology* *146*, 439-451.
- Sheng, X.R., and Matunis, E. (2011). Live imaging of the *Drosophila* spermatogonial stem cell niche reveals novel mechanisms regulating germline stem cell output. *Development* *138*, 3367-3376.
- Shergill, B., Meloty-Kapella, L., Musse, A.A., Weinmaster, G., and Botvinick, E. (2012). Optical tweezers studies on Notch: single-molecule interaction strength is independent of ligand endocytosis. *Developmental cell* *22*, 1313-1320.
- Shi, S.H., Cheng, T., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2004). APC and GSK-3 β are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Current biology : CB* *14*, 2025-2032.
- Shi, S.H., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2003). Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* *112*, 63-75.
- Shim, J., Gururaja-Rao, S., and Banerjee, U. (2013). Nutritional regulation of stem and progenitor cells in *Drosophila*. *Development* *140*, 4647-4656.

- Shimizu, K., Chiba, S., Saito, T., Takahashi, T., Kumano, K., Hamada, Y., and Hirai, H. (2002). Integrity of intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for release of the Notch2 intracellular domain. *The EMBO journal* *21*, 294-302.
- Shirayama, M., Soto, M.C., Ishidate, T., Kim, S., Nakamura, K., Bei, Y., van den Heuvel, S., and Mello, C.C. (2006). The Conserved Kinases CDK-1, GSK-3, KIN-19, and MBK-2 Promote OMA-1 Destruction to Regulate the Oocyte-to-Embryo Transition in *C. elegans*. *Current biology* : CB *16*, 47-55.
- Siegfried, K.R., and Kimble, J. (2002). POP-1 controls axis formation during early gonadogenesis in *C. elegans*. *Development* *129*, 443-453.
- Siegrist, S.E., and Doe, C.Q. (2005). Microtubule-induced Pins/Galphai cortical polarity in *Drosophila* neuroblasts. *Cell* *123*, 1323-1335.
- Slaughter, B.D., Smith, S.E., and Li, R. (2009). Symmetry breaking in the life cycle of the budding yeast. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *1*, a003384.
- Solomon, M.J., Glotzer, M., Lee, T.H., Philippe, M., and Kirschner, M.W. (1990). Cyclin activation of p34cdc2. *Cell* *63*, 1013-1024.
- Solomon, M.J., Lee, T., and Kirschner, M.W. (1992). Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Molecular biology of the cell* *3*, 13-27.
- Song, X., and Xie, T. (2002). DE-cadherin-mediated cell adhesion is essential for maintaining somatic stem cells in the *Drosophila* ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 14813-14818.
- Sonneville, R., and Gönczy, P. (2004). Zyg-11 and cul-2 regulate progression through meiosis II and polarity establishment in *C. elegans*. *Development* *131*, 3527-3543.
- Spence, A.M., Coulson, A., and Hodgkin, J. (1990). The product of fem-1, a nematode sex-determining gene, contains a motif found in cell cycle control proteins and receptors for cell-cell interactions. *Cell* *60*, 981-990.
- Srinivasan, D.G., Fisk, R.M., Xu, H., and van den Heuvel, S. (2003). A complex of LIN-5 and GPR proteins regulates G protein signaling and spindle function in *C. elegans*. *Genes & development* *17*, 1225-1239.
- Starich, T.A., Hall, D.H., and Greenstein, D. (2014). Two classes of gap junction channels mediate soma-germline interactions essential for germline proliferation and gametogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *198*, 1127-1153.

Starostina, N.G., Lim, J.M., Schvarzstein, M., Wells, L., Spence, A.M., and Kipreos, E.T. (2007). A CUL-2 ubiquitin ligase containing three FEM proteins degrades TRA-1 to regulate *C. elegans* sex determination. *Developmental cell* *13*, 127-139.

Strome, S. (1986). Asymmetric movements of cytoplasmic components in *Caenorhabditis elegans* zygotes. *Journal of embryology and experimental morphology* *97 Suppl*, 15-29.

Strome, S., and Wood, W.B. (1983). Generation of asymmetry and segregation of germ-line granules in early *C. elegans* embryos. *Cell* *35*, 15-25.

Stump, G., Durrer, A., Klein, A.L., Lutolf, S., Suter, U., and Taylor, V. (2002). Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain. *Mechanisms of development* *114*, 153-159.

Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V., and Hershko, A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Molecular biology of the cell* *6*, 185-197.

Sugiarto, S., Persson, A.I., Munoz, E.G., Waldhuber, M., Lamagna, C., Andor, N., Hanecker, P., Ayers-Ringler, J., Phillips, J., Siu, J., *et al.* (2011). Asymmetry-defective oligodendrocyte progenitors are glioma precursors. *Cancer cell* *20*, 328-340.

Suh, N., Crittenden, S.L., Goldstrohm, A., Hook, B., Thompson, B., Wickens, M., and Kimble, J. (2009). FBF and its dual control of *gld-1* expression in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Genetics* *181*, 1249-1260.

Suh, N., Jedamzik, B., Eckmann, C.R., Wickens, M., and Kimble, J. (2006). The GLD-2 poly(A) polymerase activates *gld-1* mRNA in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 15108-15112.

Sullivan, M., and Morgan, D.O. (2007). Finishing mitosis, one step at a time. *Nature reviews Molecular cell biology* *8*, 894-903.

Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., and Thomson, J.N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* *100*, 64-119.

Suzuki, A., Hirata, M., Kamimura, K., Maniwa, R., Yamanaka, T., Mizuno, K., Kishikawa, M., Hirose, H., Amano, Y., Izumi, N., *et al.* (2004). aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. *Current biology : CB* *14*, 1425-1435.

Suzuki, A., and Ohno, S. (2006). The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *Journal of cell science* *119*, 979-987.

Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kempfues, K.J., Miwa, J., and Ohno, S. (1998). Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* *125*, 3607-3614.

Tannoury, H., Rodriguez, V., Kovacevic, I., Ibourk, M., Lee, M., and Cram, E.J. (2010). CACN-1/Cactin interacts genetically with MIG-2 GTPase signaling to control distal tip cell migration in *C. elegans*. *Developmental biology* *341*, 176-185.

Tavernier, N., Noatynska, A., Panbianco, C., Martino, L., Van Hove, L., Schwager, F., Leger, T., Gotta, M., and Pintard, L. (2015). Cdk1 phosphorylates SPAT-1/Bora to trigger PLK-1 activation and drive mitotic entry in *C. elegans* embryos. *The Journal of cell biology* *208*, 661-669.

Tax, F.E., Thomas, J.H., Ferguson, E.L., and Horvitz, H.R. (1997). Identification and characterization of genes that interact with lin-12 in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *147*, 1675-1695.

Tax, F.E., Yeagers, J.J., and Thomas, J.H. (1994). Sequence of *C. elegans* lag-2 reveals a cell-signalling domain shared with Delta and Serrate of *Drosophila*. *Nature* *368*, 150-154.

Tenenhaus, C., Subramaniam, K., Dunn, M.A., and Seydoux, G. (2001). PIE-1 is a bifunctional protein that regulates maternal and zygotic gene expression in the embryonic germ line of *Caenorhabditis elegans*. *Genes & development* *15*, 1031-1040.

Tenlen, J.R., Molk, J.N., London, N., Page, B.D., and 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.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* *139*, 871-890.

Tian, X., Hansen, D., Schedl, T., and Skeath, J.B. (2004). Epsin potentiates Notch pathway activity in *Drosophila* and *C. elegans*. *Development* *131*, 5807-5815.

Timmons, L., and Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* *395*, 854.

Tio, M., Udolph, G., Yang, X., and Chia, W. (2001). cdc2 links the *Drosophila* cell cycle and asymmetric division machineries. *Nature* *409*, 1063-1067.

Toyoshima, F., Moriguchi, T., Wada, A., Fukuda, M., and Nishida, E. (1998). Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *The EMBO journal* *17*, 2728-2735.

Tsai, M.C., and Ahringer, J. (2007). Microtubules are involved in anterior-posterior axis formation in *C. elegans* embryos. *The Journal of cell biology* *179*, 397-402.

Tse, Y.C., Werner, M., Longhini, K.M., Labbe, J.C., Goldstein, B., and Glotzer, M. (2012). RhoA activation during polarization and cytokinesis of the early *Caenorhabditis elegans* embryo is differentially dependent on NOP-1 and CYK-4. *Molecular biology of the cell* 23, 4020-4031.

Tsou, M.F., Hayashi, A., and Rose, L.S. (2003). LET-99 opposes Galpha/GPR signaling to generate asymmetry for spindle positioning in response to PAR and MES-1/SRC-1 signaling. *Development* 130, 5717-5730.

Tulina, N., and Matunis, E. (2001). Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. *Science* 294, 2546-2549.

van den Heuvel, S. (2005). Cell-cycle regulation. *WormBook : the online review of C elegans biology*, 1-16.

van der Voet, M., Lorson, M.A., Srinivasan, D.G., Bennett, K.L., and van den Heuvel, S. (2009). *C. elegans* mitotic cyclins have distinct as well as overlapping functions in chromosome segregation. *Cell cycle* 8, 4091-4102.

Voutev, R., Killian, D.J., Ahn, J.H., and Hubbard, E.J. (2006). Alterations in ribosome biogenesis cause specific defects in *C. elegans* hermaphrodite gonadogenesis. *Developmental biology* 298, 45-58.

Wallenfang, M.R., and Seydoux, G. (2000). Polarization of the anterior-posterior axis of *C. elegans* is a microtubule-directed process. *Nature* 408, 89-92.

Wang, H., Ouyang, Y., Somers, W.G., Chia, W., and Lu, B. (2007a). Polo inhibits progenitor self-renewal and regulates Numb asymmetry by phosphorylating Pon. *Nature* 449, 96-100.

Wang, H., Somers, G.W., Bashirullah, A., Heberlein, U., Yu, F., and Chia, W. (2006). Aurora-A acts as a tumor suppressor and regulates self-renewal of *Drosophila* neuroblasts. *Genes & development* 20, 3453-3463.

Wang, J.W., Imai, Y., and Lu, B. (2007b). Activation of PAR-1 kinase and stimulation of tau phosphorylation by diverse signals require the tumor suppressor protein LKB1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 574-581.

Wang, L., Eckmann, C.R., Kadyk, L.C., Wickens, M., and Kimble, J. (2002). A regulatory cytoplasmic poly(A) polymerase in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 419, 312-316.

Wang, W., and Struhl, G. (2004). *Drosophila* Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch. *Development* 131, 5367-5380.

Wang, W., and Struhl, G. (2005). Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in *Drosophila*. *Development* 132, 2883-2894.

Ward, E.J., Shcherbata, H.R., Reynolds, S.H., Fischer, K.A., Hatfield, S.D., and Ruohola-Baker, H. (2006). Stem cells signal to the niche through the Notch pathway in the *Drosophila* ovary. *Current biology : CB* *16*, 2352-2358.

Ward, S., and Carrel, J.S. (1979). Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* *73*, 304-321.

Watanabe, N., Arai, H., Nishihara, Y., Taniguchi, M., Watanabe, N., Hunter, T., and Osada, H. (2004). M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 4419-4424.

Watts, J.L., Etemad-Moghadam, B., Guo, S., Boyd, L., Draper, B.W., Mello, C.C., Priess, J.R., and Kemphues, K.J. (1996). par-6, a gene involved in the establishment of asymmetry in early *C. elegans* embryos, mediates the asymmetric localization of PAR-3. *Development* *122*, 3133-3140.

Watts, J.L., Morton, D.G., Bestman, J., and Kemphues, K.J. (2000). The *C. elegans* par-4 gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development* *127*, 1467-1475.

Wen, C., Metzstein, M.M., and Greenwald, I. (1997). SUP-17, a *Caenorhabditis elegans* ADAM protein related to *Drosophila* KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling. *Development* *124*, 4759-4767.

Weng, A.P., Ferrando, A.A., Lee, W., Morris, J.P.t., Silverman, L.B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S.C., Look, A.T., and Aster, J.C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* *306*, 269-271.

Weng, A.P., Millholland, J.M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M.L., Lau, A., Wai, C., Del Bianco, C., Rodriguez, C.G., Sai, H., Tobias, J., *et al.* (2006). c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes & development* *20*, 2096-2109.

Westlund, B., Parry, D., Clover, R., Basson, M., and Johnson, C.D. (1999). Reverse genetic analysis of *Caenorhabditis elegans* presenilins reveals redundant but unequal roles for sel-12 and hop-1 in Notch-pathway signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 2497-2502.

Wharton, K.A., Johansen, K.M., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* *43*, 567-581.

- Wilkinson, H.A., Fitzgerald, K., and Greenwald, I. (1994). Reciprocal changes in expression of the receptor *lin-12* and its ligand *lag-2* prior to commitment in a *C. elegans* cell fate decision. *Cell* *79*, 1187-1198.
- Windler, S.L., and Bilder, D. (2010). Endocytic internalization routes required for delta/notch signaling. *Current biology : CB* *20*, 538-543.
- Wirtz-Peitz, F., Nishimura, T., and Knoblich, J.A. (2008). Linking cell cycle to asymmetric division: Aurora-A phosphorylates the Par complex to regulate Numb localization. *Cell* *135*, 161-173.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A., and Knust, E. (2000). Drosophila atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *The Journal of cell biology* *150*, 1361-1374.
- Wolf, N., Hirsh, D., and McIntosh, J.R. (1978). Spermatogenesis in males of the free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Journal of ultrastructure research* *63*, 155-169.
- Wolke, U., Jezuit, E.A., and Priess, J.R. (2007). Actin-dependent cytoplasmic streaming in *C. elegans* oogenesis. *Development* *134*, 2227-2236.
- Wong, B.G., Paz, A., Corrado, M.A., Ramos, B.R., Cinquin, A., Cinquin, O., and Hui, E.E. (2013). Live imaging reveals active infiltration of mitotic zone by its stem cell niche. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* *5*, 976-982.
- Wu, H., Feng, W., Chen, J., Chan, L.N., Huang, S., and Zhang, M. (2007a). PDZ domains of Par-3 as potential phosphoinositide signaling integrators. *Molecular cell* *28*, 886-898.
- Wu, L., Aster, J.C., Blacklow, S.C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S., and Griffin, J.D. (2000). MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nature genetics* *26*, 484-489.
- Wu, M., Kwon, H.Y., Rattis, F., Blum, J., Zhao, C., Ashkenazi, R., Jackson, T.L., Gaiano, N., Oliver, T., and Reya, T. (2007b). Imaging hematopoietic precursor division in real time. *Cell stem cell* *1*, 541-554.
- Xie, T., and Li, L. (2007). Stem cells and their niche: an inseparable relationship. *Development* *134*, 2001-2006.
- Xie, T., and Spradling, A.C. (1998). *decapentaplegic* is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Cell* *94*, 251-260.
- Xie, T., and Spradling, A.C. (2000). A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science* *290*, 328-330.

- Xue, B., Krishnamurthy, K., Allred, D.C., and Muthuswamy, S.K. (2013). Loss of Par3 promotes breast cancer metastasis by compromising cell-cell cohesion. *Nature cell biology* *15*, 189-200.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Izumi, N., Suzuki, A., Mizuno, K., and Ohno, S. (2006). Lgl mediates apical domain disassembly by suppressing the PAR-3-aPKC-PAR-6 complex to orient apical membrane polarity. *Journal of cell science* *119*, 2107-2118.
- Yamashita, Y.M., Jones, D.L., and Fuller, M.T. (2003). Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* *301*, 1547-1550.
- Yamashita, Y.M., Mahowald, A.P., Perlin, J.R., and Fuller, M.T. (2007). Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division. *Science* *315*, 518-521.
- Yamashita, Y.M., Yuan, H., Cheng, J., and Hunt, A.J. (2010). Polarity in stem cell division: asymmetric stem cell division in tissue homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a001313.
- Yang, J., Bardes, E.S., Moore, J.D., Brennan, J., Powers, M.A., and Kornbluth, S. (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes & development* *12*, 2131-2143.
- Yeh, E., Dermer, M., Comisso, C., Zhou, L., McGlade, C.J., and Boulianne, G.L. (2001). Neuralized functions as an E3 ubiquitin ligase during *Drosophila* development. *Current biology : CB* *11*, 1675-1679.
- Yoo, A.S., Bais, C., and Greenwald, I. (2004). Crosstalk between the EGFR and LIN-12/Notch pathways in *C. elegans* vulval development. *Science* *303*, 663-666.
- Yoshimura, S., Murray, J.I., Lu, Y., Waterston, R.H., and Shaham, S. (2008). *mls-2* and *vab-3* Control glia development, *hlh-17/Olig* expression and glia-dependent neurite extension in *C. elegans*. *Development* *135*, 2263-2275.
- Yuan, H., Chiang, C.Y., Cheng, J., Salzmann, V., and Yamashita, Y.M. (2012). Regulation of cyclin A localization downstream of Par-1 function is critical for the centrosome orientation checkpoint in *Drosophila* male germline stem cells. *Developmental biology* *361*, 57-67.
- Zachariae, W., and Nasmyth, K. (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes & development* *13*, 2039-2058.
- Zhang, B., Gallegos, M., Puoti, A., Durkin, E., Fields, S., Kimble, J., and Wickens, M.P. (1997). A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line. *Nature* *390*, 477-484.

Zhang, Y., and Emmons, S.W. (1995). Specification of sense-organ identity by a *Caenorhabditis elegans* Pax-6 homologue. *Nature* 377, 55-59.

Zonies, S., Motegi, F., Hao, Y., and Seydoux, G. (2010). Symmetry breaking and polarization of the *C. elegans* zygote by the polarity protein PAR-2. *Development* 137, 1669-1677.

Annexe 1

Article

MAP kinase signaling antagonizes PAR-1 function during polarization of the early *Caenorhabditis elegans* embryo.

Publié dans : Genetics. 2009 Nov;183(3):965-77 PMID:PMC2778991

Contribution des co-auteurs

Ma contribution à cet article est faible. J'ai uniquement effectué les expériences et analyses pour les figures S2, S3, S4, S5.

MAP Kinase Signaling Antagonizes PAR-1 Function During Polarization of the Early *Caenorhabditis elegans* Embryo

Annina C. Spilker,^{*1} Alexia Rabilotta,[†] Caroline Zbinden,^{*} Jean-Claude Labbé^{†,2}
and Monica Gotta^{*,1,2,3}

^{*}Swiss Federal Institute of Technology, Institute of Biochemistry, ETH Hönggerberg, 8093 Zürich, Switzerland, [†]Institute of Research in Immunology and Cancer, Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, Québec H3C 3J7, Canada and ²Department of Genetic Medicine and Development, Faculty of Medicine, University of Geneva, 1211 Geneva, Switzerland

Manuscript received June 26, 2009
Accepted for publication August 26, 2009

ABSTRACT

PAR proteins (**partitioning defective**) are major regulators of cell polarity and asymmetric cell division. One of the *par* genes, *par-1*, encodes a Ser/Thr kinase that is conserved from yeast to mammals. In *Caenorhabditis elegans*, *par-1* governs asymmetric cell division by ensuring the polar distribution of cell fate determinants. However the precise mechanisms by which PAR-1 regulates asymmetric cell division in *C. elegans* remain to be elucidated. We performed a genomewide RNAi screen and identified six genes that specifically suppress the embryonic lethal phenotype associated with mutations in *par-1*. One of these suppressors is *mpk-1*, the *C. elegans* homolog of the conserved mitogen activated protein (MAP) kinase ERK. Loss of function of *mpk-1* restored embryonic viability, asynchronous cell divisions, the asymmetric distribution of cell fate specification markers, and the distribution of PAR-1 protein in *par-1* mutant embryos, indicating that this genetic interaction is functionally relevant for embryonic development. Furthermore, disrupting the function of other components of the MAPK signaling pathway resulted in suppression of *par-1* embryonic lethality. Our data therefore indicates that MAP kinase signaling antagonizes PAR-1 signaling during early *C. elegans* embryonic polarization.

ASYMMETRIC cell division, a process in which a mother cell divides in two different daughter cells, is a fundamental mechanism to achieve cell diversity during development. We use the early embryo of *Caenorhabditis elegans* as a model system to study asymmetric cell division. The *C. elegans* one-cell embryo divides asymmetrically along its anteroposterior axis, generating two cells of different sizes and fates: the larger anterior daughter cell will generate somatic tissues while the smaller posterior daughter cell will generate the germline (SULSTON *et al.* 1983).

A group of proteins called PAR proteins (**partitioning defective**) is required for asymmetric cell division in *C. elegans* (KEMPHUES *et al.* 1988). Depletion of any of the seven *par* genes (*par-1* to *-6* and *pke-3*) leads to defects in asymmetric cell division and embryonic lethality (KEMPHUES *et al.* 1988; KIRBY *et al.* 1990; TABUSE *et al.* 1998; HUNG and KEMPHUES 1999; HAO *et al.* 2006). PAR-3 and PAR-6 are conserved proteins that contain PDZ-domains

and form a complex with PKC-3 (ETEMAD-MOGHADAM *et al.* 1995; IZUMI *et al.* 1998; TABUSE *et al.* 1998; HUNG and KEMPHUES 1999). This complex becomes restricted to the anterior cortex of the embryo in response to spatially defined actomyosin contractions occurring in the embryo upon fertilization (GOLDSTEIN and HIRD 1996; MUNRO *et al.* 2004). The posterior cortex of the embryo that becomes devoid of the anterior PAR proteins is occupied by the RING protein PAR-2 and the Ser/Thr kinase PAR-1 (GUO and KEMPHUES 1995; BOYD *et al.* 1996; CUENCA *et al.* 2003). Once polarized, the anterior and posterior PAR proteins mutually exclude each other from their respective cortices (ETEMAD-MOGHADAM *et al.* 1995; BOYD *et al.* 1996; CUENCA *et al.* 2003; HAO *et al.* 2006). Loss of function of the gene *par-1*, as opposed to loss of most other *par* genes, results in embryos that exhibit only subtle effects on the polarized cortical domains occupied by the other PAR proteins (CUENCA *et al.* 2003). However defects in this gene are associated with a more symmetric division in size, an aberrant distribution of cell fate specification markers, altered cell fates of the daughter cells of the embryo, and ultimately embryonic lethality (KEMPHUES *et al.* 1988; GUO and KEMPHUES 1995).

PAR-1 controls asymmetric cell division and cell fate specification by regulating the localization of the two highly similar CCCH-type zinc-finger proteins MEX-5

Supporting information is available online at <http://www.genetics.org/cgi/content/full/genetics.109.106716/DC1>.

¹Present address: Goodman Cancer Centre, McGill University, Montréal, Québec H3A 1A3, Canada.

²These authors contributed equally to this work.

³Corresponding author: Université de Genève, CMU/GEDEV, Rue Michel Servet, 1211 Geneva 4, Switzerland.

and MEX-6 (referred to as MEX-5/6). MEX-5 and MEX-6 are 70% identical in their amino acid sequence and fulfill partially redundant functions in the embryo (SCHUBERT *et al.* 2000). In wild-type animals, endogenous MEX-5 and GFP fusions of MEX-6 localize primarily to the anterior of the embryo while both proteins are evenly distributed in *par-1* mutant embryos (SCHUBERT *et al.* 2000; CUENCA *et al.* 2003). This suggests that in wild-type animals, PAR-1 acts in part by restricting MEX-5 and MEX-6 to the anterior of the embryo. The precise mechanism of this regulation is not known, but an elegant study performed for MEX-5 indicates that differential protein mobility in the anterior and posterior cytoplasm of the one-cell embryo contributes to this asymmetry (TENLEN *et al.* 2008). While increased mobility in the posterior of the one-cell embryo correlates with a *par-1*- and *par-4*-dependent phosphorylation on MEX-5, the kinase directly phosphorylating MEX-5 remains to be identified (TENLEN *et al.* 2008).

Some of the phenotypes associated with loss of *par-1* function are dependent on the function of *mex-5* and *mex-6*. First, loss of function of *par-1* leads to a decreased stability and aberrant localization of the posterior cell fate specification marker PIE-1, a protein that is usually inherited by the posterior daughter cell in wild-type animals and ensures the correct specification of the germline (MELLO *et al.* 1996; SEYDOUX *et al.* 1996). This decreased stability is dependent on *mex-5/6* function as PIE-1 levels are restored, albeit with symmetrical distribution, in *mex-6(RNAi)*; *mex-5(RNAi)*; *par-1(b274)* embryos (SCHUBERT *et al.* 2000; CUENCA *et al.* 2003; DERENZO *et al.* 2003). Second, embryos lacking *par-1* function exhibit decreased amounts of P granules in the one-cell embryo, while these markers are present in *mex-6(pk440)*; *mex-5(zu199)*; *par-1(RNAi)* embryos of comparable age (CHEEKS *et al.* 2004). Third, in *par-1(RNAi)* one-cell embryos the posterior cortical domain occupied by the polarity protein PAR-2 is extended anteriorly, when compared to wild-type embryos (CUENCA *et al.* 2003). This anterior extension is rescued in embryos deficient for both *par-1* and *mex-5/6* (CUENCA *et al.* 2003). Taken together, these results indicate that *par-1* acts in the embryo—at least in part—by regulating the localization and/or activity of the proteins MEX-5 and MEX-6. However, it remains unclear whether other proteins can modulate PAR-1 function to affect MEX-5/6 activity.

To gain insight into the mechanisms of *par-1* function in the embryo, we sought to identify genes that act together with *par-1* during embryonic development. We performed an RNAi-based screen for genetic interactors of the temperature-sensitive allele *par-1(zu310)*, using the embryonic lethal phenotype of this mutant as a readout. This method has proven successful in previous screens to identify genes involved in early embryonic processes (LABBÉ *et al.* 2006; O'ROURKE *et al.* 2007). We were able to identify six genes that, upon disruption of

their function, suppress the embryonic lethal phenotype of *par-1* mutant embryos. One of these genes is *mpk-1*, the *C. elegans* homolog of the highly conserved MAP kinase ERK. Closer analysis subsequently showed that reduction of function of *mpk-1* not only increases viability of *par-1* mutant embryos, but also reverts several polarity phenotypes associated with loss of function of *par-1*. Our data indicate that *mpk-1* antagonizes *par-1* activity to regulate polarization and asymmetric cell divisions in the early embryo.

MATERIALS AND METHODS

Strains: Strains were maintained at 15° unless noted otherwise and cultured according to BRENNER (1974). N2 (Bristol) was used as a wild-type strain together with the following mutant alleles: LGI, *dhc-1(or195)*; *air-2(or207)*; LGIII, *unc-79(e1068)*; *mpk-1(ga111)*; LGV, *sqf-3(sc8)*; *par-1(it90)*; *par-1(zu310)*. All statistical analyses were carried out using Student's *t*-test.

Sequencing of *par-1(zu310)*: To sequence the coding region of *par-1(zu310)* animals were lysed for 1 hr at 60° in buffer (50 mM KCl; 2.5 mM MgCl₂; 10 mM Tris HCl pH 8.3; 0.45% NP40; 0.45% Tween 20; 0.01% gelatin) supplemented with 0.4 µg/µl of proteinase K, followed by inactivation of the enzyme for 15 min at 95°. The exons of the gene *par-1* (WORMBASE 2008) were amplified using Taq polymerase according to standard procedures. Two independent lysates were sequenced for every amplified stretch. The deviant region in *par-1(zu310)* was amplified from three independent wild-type and *par-1(zu310)* mutant lysates using the following primers: 5'-GTCGGAAA TACGAAACAGCC (forward) and 5'-CCATCAAATGGTAGC TTCCG (reverse).

DIC microscopy: For time-lapse microscopy, embryos were dissected from gravid hermaphrodites and mounted on a 2% agarose pad in M9 buffer. APE94 temperature-controlled stage (Linkam Scientific) was used to ensure a constant temperature of 22° during acquisition. Images were acquired with a Hamamatsu Orca ER digital camera mounted on a Leica DM6000B microscope (Leica Microsystems), and the acquisition was controlled by Openlab software (Improvision). Images were acquired at 10-sec intervals using Plan Apochromat 63X/1.4 NA objectives. Image analysis was performed using ImageJ software (National Institutes of Health, NIH).

Genomewide RNAi-based screen: The RNAi-based screen was performed in liquid medium using a Biomek FX robot (Beckman Coulter, courtesy of M. Peter) following a methodology described previously (LABBÉ *et al.* 2006). The embryonic lethality of *par-1(zu310)* animals was assessed after incubation at 22°. The RNAi screen was performed in duplicate for each clone and yielded 1639 and 1389 candidates, respectively. Of these candidates, 286 were identified in both assays and were kept for further analysis. All 286 bacterial clones were tested by feeding bacterial clones on NGM plates containing 1 mM IPTG to *par-1(zu310)* animals from L1 stage on. Plates were incubated at 15° for 2.5 days (until L3/L4 stage) and subsequently shifted to 22°. Adults were removed the next day and the progeny were examined for viability the day after removal. Using this method all 286 clones were tested in duplicate by feeding bacterial clones to L1 larvae on agar plates. This assay yielded 60 candidates that were estimated to have more hatching progeny when compared to *par-1(zu310)* animals fed with vector alone. These 60 candidates were subsequently retested in two independent assays (two plates per assay) and the embryonic lethal phenotype was determined by counting hatched *vs.* unhatched progeny and compared with control

plates (data not shown). All candidates that resulted in a viability that was significantly higher than that of the empty vector control ($P < 0.05$) were kept for further analysis. These remaining clones were then tested in three more assays (three plates each). This resulted in the confirmation of eight clones that significantly suppressed *par-1(zu310)* (Table 1), each of which was confirmed in its molecular identity by sequencing. Viability in other strains was assessed using the same approach. However, the assays performed with the alleles *dhc-1(or195)* and *air-2(or207)* were carried out at 20° and 18°, respectively.

Generation of double mutants: To generate the mutant strains *unc-79(e1068) mpk-1(ga111)*; *par-1(zu310)* and *unc-79(e1068)*; *par-1(zu310)*, males of the allele *par-1(zu310)* were mated with *unc-79(e1068) mpk-1(ga111)* or *unc-79(e1068)* hermaphrodites at permissive temperature. Three animals of the resulting F₁ progeny were singled and allowed to lay eggs. Subsequently 30 F₂ progeny were singled and allowed to lay eggs at permissive temperature before being transferred to 25°. *par-1(zu310)* homozygous F₂ animals threw dead embryos at this restrictive temperature (escaping larvae developed into sterile adults) as determined under a dissecting scope. *unc-79(e1068) mpk-1(ga111)*; *par-1(zu310)* or *unc-79(e1068)*; *par-1(zu310)* homozygous animals were identified among the F₃ progeny on the basis of their sluggish, uncoordinated movement. The presence of a homozygous *par-1(zu310)* allele was reconfirmed for every double mutant background by sequencing (see above). To test the viability of the double mutants, staged L1 larvae of the indicated genotypes were put to 22°. After 2.5–3 days, three to six adults were cloned on new plates and allowed to lay eggs for 12 hr before removal. The viability of the progeny was counted 24 hr after removal of the adults.

To assess embryonic viability at 25°, L3/L4 animals were shifted from 15° to 25° for 24 hr (to circumvent the sterility conferred by the *mpk-1ts* allele at elevated temperature), transferred to a new plate, and allowed to lay eggs for ~12 hr before removal of the mothers. Embryonic viability was counted ≥18 hr after removal of the mothers.

For phenotypic analysis, staged L1 animals were shifted to 22° for 2.5 days. Upon reaching adulthood, the animals were sacrificed to examine their progeny. For examination of sterility, progeny were allowed to develop until adulthood and thereafter examined by DIC microscopy for the presence or absence of oocytes and embryos. For the phenotypic analysis, wild-type animals were compared with animals of the following genotypes: *par-1(zu310)* single mutants, *unc-79(e1068) mpk-1(ga111)* double mutants, or *unc-79(e1068) mpk-1(ga111)*; *par-1(zu310)* triple mutants. *unc-79* encodes a protein that localizes—according to GFP reporter constructs—to the nervous system and the ventral nerve cord (WORMBASE 2008). Moreover, *unc-79* is required for locomotion of the animals and for sensitivity to specific volatile anesthetics (WORMBASE 2008). As *unc-79(e1068)* did not influence embryonic lethality in the *par-1(zu310)* background (as shown in Table 2), we conclude that *unc-79* is not influencing *par-1* function.

RNAi: For RNAi experiments targeting different components of the MAP kinase pathway by feeding, staged animals were allowed to develop until L3/L4 stage for 2.5 days at 15° on standard NGM plates seeded with the bacterial strain OP50. They were subsequently washed several times in M9 to remove bacteria and transferred on 1-mm IPTG plates seeded with HT115(DE3) bacteria transformed with the RNAi constructs. Worms were fed on these plates for 1–1.5 days until progeny were laid and subsequently removed from the plates. Survival of the progeny was scored 24 hr after removal of the parents. Constructs for RNA-mediated interference of components of the MAP kinase pathway were taken from the genomewide collection of feeding constructs (KAMATH *et al.* 2003), unless noted otherwise. For RNAi of *mpk-1*, the feeding construct

targeting both the 45-kDa and the 55-kDa isoform of *mpk-1* has been used (KAMATH *et al.* 2003). *mek-2*, *lin-45*, and *ksr-2* targeting feeding constructs were generated by cloning full-length PCR fragments generated on cDNA libraries (for *mek-2* and *lin-45*) or on cloned cDNA (clone yk343d6, kindly provided by Y. Kohara, encoding for *ksr-2a*) into a gateway-adapted L4440 vector.

Confocal microscopy: Confocal imaging was performed using a SP2 confocal microscope (Leica Microsystems) equipped with Leica software. Antibodies recognizing PAR-1 (kindly provided by J. Ahringer) and PAR-3 (LABBÉ *et al.* 2006) were generated as previously described (ETEMAD-MOGHADAM *et al.* 1995; GUO and KEMPHUES 1995) and affinity purified from serum on a nitrocellulose strip containing bacterially expressed antigen. The mouse anti-PIE-1 (TENENHAUS *et al.* 1998) and mouse anti-MEX-5 (SCHUBERT *et al.* 2000) antibodies were generously shared by J. Priess. Oic1d4, a mouse antibody recognizing P granules, and P4A1, a mouse antibody recognizing PAR-3, were obtained from Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa). For rabbit anti-PAR-1, rabbit anti-PAR-3, mouse P4A1, and Oic1D4 staining, samples were snap frozen in liquid nitrogen and subsequently fixed for 20 min in MeOH. For anti-PIE-1 and anti-MEX-5 stainings in contrast, samples were squashed for 20 min in 3% PFA solution in a humid chamber before freeze-crack and MeOH incubation.

After MeOH fixation, slides were washed three times in PBS, supplemented with 0.2% Tween 20 (later on referred to as PBST) before incubation with primary antibodies overnight at 4°. After three washes in PBST, slides were then incubated with secondary antibody solution (including DAPI) for 45 min at 37°. Slides were subsequently washed three times before being mounted in Mowiol (6 g glycerol, 2.4 g Mowiol (Calbiochem 475904), 6 ml H₂O, 12 ml 0.2 M Tris pH 8.5, 0.1% DABCO). For each staining, a second antibody was used on the same sample to validate antibody accessibility of the imaged embryos. The secondary antibodies used were Alexa488 or Alexa568-coupled anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Molecular Probes).

Quantifications of stainings were performed using ImageJ software (NIH). Quantifications of MEX-5 and PIE-1 fluorescence intensities were performed on two-cell embryos before polarization of P₁, measuring half-moon shaped areas (sparing the nucleus) either in the dorsal or ventral cytoplasm of AB and P₁. Background areas of comparable size were measured outside the embryo and subtracted from the average fluorescence intensity. From these corrected values, ratios of either AB:P₁ (MEX-5) or P₁:AB (PIE-1) fluorescence intensities were calculated. The amount and distribution of P granules was judged by eye. PAR-1 domain size and PAR-3 domain size in individual stainings were determined after imaging the middle plane of the embryo and measuring the respective length of the domain in the embryo, compared to the total embryo length. The domain borders were determined by eye. PAR-1 and PAR-3 domain size were quantified in separate experiments as both antibodies were produced in rabbit. To visualize the domain overlap, costainings with rabbit anti-PAR-1 and mouse anti-PAR-3 (P4A1) on the same embryos were performed and imaged on the upper cortex of the embryos.

PAR-1 asymmetry at four-cell stage was assessed by measuring PAR-1 average fluorescence intensity along a line on the cortex between EMS/P₂ and along the cortex between ABp/P₂. Values were background corrected using comparable lines in the cytoplasm of ABp and subtracted from the cortex values. The gradient was determined by calculating the ratio between the two cortices.

Germline phenotypes of the posterior gonad arm were observed by DIC microscopy on F₁ progeny that were sedated in M9 buffer, supplemented with 10 mM Na₂S₂O₃. To generate F₁

TABLE 1
Embryonic viability after candidate RNAi

RNAi ^a	<i>par-1(zu310)</i>	<i>par-1(iu90)</i>	<i>air-2(or207)</i>	<i>dhc-1(or195)</i>	NCBI KOGs ^b
<i>asd-2</i>	34 ± 20*	0 ± 0	14 ± 11	53 ± 14*	RNA-binding protein, KH domain
D2030.4	20 ± 10*	0 ± 0	7 ± 9	8 ± 6**	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit, NDUF7/ B18
F36A2.7	34 ± 18*	0 ± 0	8 ± 8**	17 ± 13	Unknown
C34B2.8	34 ± 12*	0 ± 0	4 ± 2**	5 ± 3**	NADH:ubiquinone oxidoreductase, subunit B16.6, cell death-regulatory protein
<i>ntl-2</i>	47 ± 15*	0 ± 0	1 ± 1**	6 ± 4**	Predicted transcriptional regulator
F23H11.3	39 ± 22*	0 ± 0	13 ± 10	46 ± 22*	Succinyl-CoA synthetase, α subunit
<i>mpk-1</i>	23 ± 9*	0 ± 0	15 ± 12	25 ± 15	Mitogen activated protein kinase
K03B4.4	18 ± 10*	0 ± 0	12 ± 14	17 ± 12	Unknown
<i>mex-5</i>	2 ± 2	ND	ND	ND	
<i>mex-6</i>	35 ± 20*	ND	ND	ND	
Vector	7 ± 5	0 ± 0	13 ± 13	18 ± 13	

Values correspond to the number of hatched progeny divided by total progeny ($n \geq 9$ plates in three assays) ± standard deviation, except for *par-1(iu90)* assays ($n = 3$ plates in one assay), and *mex-5* and *mex-6* assays ($n = 6$ plates in two assays).

^a Gene name or cosmid number of the genes targeted by RNAi.

^b NCBI KOGs (conserved orthologous groups) are determined by reciprocal best BlastP hits between domains of eukaryotic proteins from highly divergent species. NCBI KOGs were taken from WormBase (WORMBASE 2008).

* Values significantly higher than vector control (Student's unpaired *t*-test; $P < 0.05$).

** Values lower than vector control (Student's unpaired *t*-test; $P < 0.05$).

progeny, mother animals were kept at 22° from L1 stage on until egg laying. The resulting progeny were kept at 22° until adulthood (1 day post L4 stage). The representative images shown have been acquired with a 63× objective on a DM6000B Leica microscope (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) microscope using Openlab software (Improvision/Perkin Elmer, Coventry, U.K.) and have been subsequently assembled manually using Photoshop.

RESULTS

Characterization of the allele *par-1(zu310)*: To identify genes that act together with *par-1*, we sought to perform an RNAi-based screen for suppressors of the embryonic lethality caused by loss of *par-1* function. *par-1* gene function is provided maternally, so that *par-1* homozygous mutant worms are themselves viable, but produce only dead progeny. Therefore, we chose the temperature-sensitive allele *par-1(zu310)* (KAO *et al.* 2004), as the use of conditional alleles of embryonic lethal genes facilitates growth in large scale. Since the embryonic phenotypes of *par-1(zu310)* have not been characterized, we first performed a phenotypic analysis of this allele. We found that *par-1(zu310)* mutant animals exhibit phenotypes closely resembling those reported for other, previously characterized *par-1* alleles (KEMPHUES *et al.* 1988; GUO and KEMPHUES 1995; SCHUBERT *et al.* 2000). Embryos produced by *par-1(zu310)* mutant mothers (hereafter referred to as *par-1* embryos) are inviable at 25° (supporting information, Table S2) and nearly inviable at 22° when compared to wild-type embryos (Table 1). The semi-restrictive temperature of 22° was chosen for all subsequent analyses as screening

at this temperature would allow us to identify weak *par-1* suppressors. Like previously published alleles of *par-1*, *par-1(zu310)* mutant embryos exhibit a more symmetric division of the one-cell embryo (Figure 1, A and B; Figure 3A), more synchronous cell divisions at the two-cell stage (Figure 1, C and D; Figure 3B) and aberrant localization of different cell fate specification markers (Figure 1, E and F; Figure 4). Shifting adult mothers and embryos from permissive to restrictive temperature (or vice versa) allowed us to determine that the temperature-sensitive period of the allele *par-1(zu310)* starts prior to fertilization and does not end before the 28-cell stage (Figure S1). This indicates that the allele *par-1(zu310)* is a suitable tool to study the function of *par-1* during early embryogenesis.

To gain insight into the molecular lesion underlying the *par-1(zu310)* mutation, we sequenced the coding region of the *par-1* gene in this mutant and identified a single nucleotide change in the region encoding the kinase domain. This change of T→A in position 917 (with respect to cDNA prediction for *par-1a*) causes an isoleucine-to-asparagine change in the amino acid sequence, affecting all four predicted splice variants (Figure 1G) (WORMBASE 2008). Consistent with previous reports for other alleles of *par-1* that carry point mutations in the kinase domain (GUO and KEMPHUES 1995), the PAR-1 protein is still detectable by Western blot analysis on embryonic extracts of *par-1(zu310)* animals at both elevated and completely restrictive temperature (Figure S2 and data not shown). These results are consistent with *par-1(zu310)* having residual activity of PAR-1 at semi-restrictive temperature.

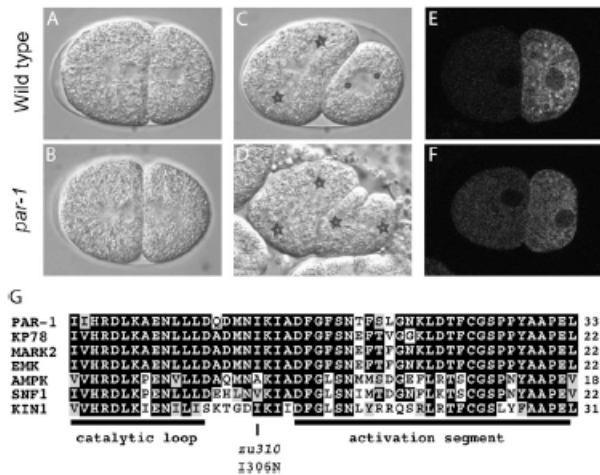


FIGURE 1.—Characterization of the allele *par-1(zu310)*. The allele *par-1(zu310)* exhibits phenotypes previously described for other alleles of *par-1* and bears a lesion in the *par-1* coding sequence. (A and B) Images taken from timelapse recordings, showing embryos undergoing the first division. Note the less pronounced asymmetry in cell size of the two daughter cells generated in *par-1(zu310)* mutant embryos when compared to wild-type embryos. (C and D) Images from time lapse recordings showing two-cell embryos undergoing asynchronous division (wild type) or synchronous division (*par-1(zu310)*). Asterisks mark spindle poles, circles mark centrosomes before nuclear envelope breakdown. (E and F) Two cell-embryos stained with anti-PIE-1 antibodies. PIE-1 is enriched in the posterior daughter cell in wild-type embryos and is more evenly distributed in *par-1(zu310)* mutants. Embryo length is ~50 μ m. (G) Sequence alignment of a part of the kinase domain in PAR-1 and human KP78, rat MARK2, mouse EMK, rat AMPK, and yeast SNF1 and KIN1 according to GUO and KEMPHUES (1995). *par-1(zu310)* contains a lesion in the kinase domain leading to an I306N exchange. All

orthologs carry nonpolar residues in this position as opposed to *par-1(zu310)*. The alignment was generated with ClustalW software. BoxShade backgrounds show identical residues as solid; similar residues are shaded. Borders of catalytic loop and activation segment are assigned according to PANNEERSELVAM *et al.* (2006).

Identification of genetic interactors of *par-1*: We performed an RNAi-based screen for genes that suppress the embryonic lethality caused by the temperature-sensitive allele *par-1(zu310)*, testing 93% of the clones in an RNAi library of 16,757 bacterial strains each expressing a dsRNA corresponding to a *C. elegans* gene (KAMATH *et al.* 2003). Of 15,671 clones analyzed in duplicate, 286 candidates suppressed the embryonic lethal phenotype of the *par-1(zu310)* mutant animals in both assays (see Table S1).

To verify which of these candidates are reliable suppressors of the embryonic lethal phenotype of *par-1(zu310)*, we tested them in multiple assays by feeding bacterial clones on agar plates to *par-1(zu310)* mutant L1 larvae (see MATERIALS AND METHODS). This led to the identification of eight bacterial clones that can result in a significant ($P < 0.05$) increase in the viability of *par-1(zu310)* mutant animals (Table 1).

The suppression assays were performed at a semi-restrictive temperature for *par-1(zu310)*. To examine if the identified clones can suppress a strong loss of *par-1* function, we tested whether the suppressors can restore viability in animals mutant for *par-1(it90)*, which is a presumptive null allele of *par-1* (GUO and KEMPHUES 1995). We found that no clone could restore viability of *par-1(it90)* animals in these conditions (Table 1). These results suggest that the suppressors that we identified cannot bypass the requirement for *par-1*.

To investigate if the identified suppressors are specific for a *par-1* conditional mutant background, we assessed whether targeting these candidates by RNAi also alters the embryonic lethal phenotype of two other temperature-

sensitive mutant alleles that affect embryonic development, *air-2(or207)* and *dhc-1(or195)* (SEVERSON *et al.* 2000; HAMILL *et al.* 2002). *air-2* encodes the *C. elegans* homolog of Aurora B kinase and *dhc-1* encodes a *C. elegans* dynein heavy chain, and loss of function of either gene affects early embryonic development without any obvious consequence on polarity and cell fate specification. Of the eight suppressors identified in the screen, we found that RNAi disruption of none of them could suppress the lethality of *air-2(or207)* mutants, while RNAi disruption of two of them, *asd-2* and *F23H11.3*, partially restored embryonic viability of *dhc-1(or195)* mutants (Table 1). We therefore conclude that the effect of *asd-2* and *F23H11.3* on *par-1(zu310)* embryonic viability might be unspecific. This is consistent with previously published data indicating that *asd-2(RNAi)* is able to act as a genetic suppressor in a variety of mutant alleles, including *dhc-1(or195)*, *lit-1(or131)* and *spn-4(or191)* (O'ROURKE *et al.* 2007).

The genes that specifically suppress the embryonic lethal phenotype of *par-1(zu310)* mutant, except for *K03B4.4*, have previously been reported to exhibit embryonic lethality upon their depletion by RNAi in wild-type or RNAi-sensitive mutant backgrounds (FRASER *et al.* 2000; KAMATH *et al.* 2003; CERON *et al.* 2007). This is consistent with the notion that these genes are, like *par-1*, required for maturation of germ cells or during embryonic development. Under the conditions used for the suppression however, knockdown of the function of these genes leads, if so, only to subtle embryonic lethality in wild-type animals (data not shown).

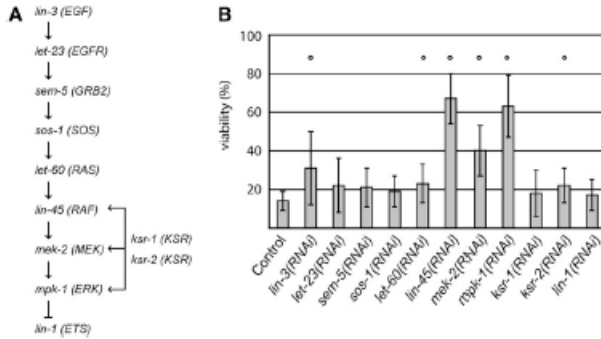


FIGURE 2.—Genetic interaction between *par-1* and the MAP kinase pathway. (A) Schematic representation of genes involved in MAP kinase signaling required for vulva formation in *C. elegans* (adapted from SUNDARAM 2006). For clarity, only the core components are depicted. Human homologs of *C. elegans* genes are indicated in parentheses. (B) Reduction of function of several genes in the MAP kinase pathway increases viability in a *par-1(zu310)* mutant background. Values correspond to average viability of the progeny as percentage of total progeny \pm standard deviation ($n = 9$ plates in three independent assays, except for *let-23(RNAi)*, which corresponds to three plates in one assay). Values significantly different from *par-1(zu310)* control animals are marked with a circle ($P \leq 0.03$).

The suppressors form a heterogeneous group of genes as judged from the information available on their molecular nature (Table 1). For two genes, F36A2.7 and K03B4.4, no clear homolog has been identified yet in other species and no molecular function has been proposed. D2030.4 and C34B2.8 encode subunits of the NADH:ubiquinone oxidoreductase, a component of the mitochondrial electron transport chain, and are therefore key players in cellular respiration. *ntl-2* encodes a protein similar to NOT2, a component of the transcriptional regulatory complex CCR4/NOT. Reduction of function of *ntl-2* is synthetic lethal with a mutation in *ksr-1*, a gene in the MAP kinase signaling pathway, indicating that this gene may impinge on MAP kinase signaling (ROCHELEAU *et al.* 2008). Finally, *mpk-1*, the gene encoding the central kinase of the highly conserved MAP kinase pathway (Figure 2A), also suppressed embryonic lethality in a *par-1* mutant background.

Taken together, we found that RNAi targeting eight genes suppresses the lethal phenotype of *par-1(zu310)* animals. Of these genes, six were found to be specific for suppressing *par-1(zu310)*.

***mpk-1*, a suppressor of *par-1(zu310)* embryonic lethality:** We next focused our efforts on defining the relationships between *par-1* and one of the suppressors identified, *mpk-1*. The MAP kinase pathway is essential for the regulation of a variety of different cellular processes from yeast to mammals (SCHLESSINGER 2000) and aberrant regulation of this pathway has been largely implicated in the development and progression of cancer (DHILLON *et al.* 2007). In *C. elegans*, MAP kinase signaling has been best characterized for its role in cell fate specification during the formation of the vulva (LACKNER *et al.* 1994; WU and HAN 1994). Interestingly, abrogating the function of genes that either positively or negatively regulate MAP kinase signaling impairs embryonic development (PAGE *et al.* 2001; HAJNAL and BERSET 2002; KAO *et al.* 2004; SONNICHSEN *et al.* 2005). Moreover, the gene *par-1* was reported to act antagonistically to MAP kinase signaling during vulva development (KAO *et al.* 2004; YODER *et al.* 2004) and a

PAR-1-related kinase interacts with the MAP kinase scaffold Ksr in mammalian cells (MULLER *et al.* 2001), suggesting that PAR-1 negatively regulates MAP kinase signaling in these contexts. This is consistent with our results that reduction of *mpk-1* function leads to suppression of the embryonic lethality exhibited by *par-1(zu310)* mutants and suggests that the genetic interaction of *par-1* and *mpk-1* in embryonic development is a conserved mechanism. We therefore decided to address whether *mpk-1* acts together with *par-1* during embryonic development in *C. elegans* using both genetic and cell biological approaches.

As RNA interference can result in off-target effects (RUAL *et al.* 2007), we first confirmed the genetic interaction observed between *mpk-1(RNAi)* and *par-1(zu310)* by generating a double mutant strain carrying the allele *par-1(zu310)* together with the temperature-sensitive loss-of-function allele *mpk-1(ga111)* (LACKNER and KIM 1998). The allele *mpk-1(ga111)* carries a point mutation near the predicted MEK binding site and the encoded MPK-1 protein was proposed to be less prone to activation than its wild-type counterpart (LACKNER and KIM 1998). We found that while only $4 \pm 4\%$ of the *unc-79(e1068); par-1(zu310)* mutant embryos escaped embryonic lethality at semi-restrictive temperature, $38 \pm 9\%$ of the *unc-79(e1068) mpk-1(ga111); par-1(zu310)* mutant embryos were viable ($P = 3 \times 10^{-8}$) (Table 2). Consistent with our RNAi results, we found that the allele *mpk-1(ga111)* cannot suppress the lethality of *par-1(zu310)* animals at fully restrictive temperature (Table S2), and phenotypic analysis demonstrated that the *par-1*-dependent embryonic phenotypes were not suppressed in *mpk-1(ga111); par-1(RNAi)* animals at this temperature (Figure S3). This again suggests that residual PAR-1 activity is required for *mpk-1* to efficiently suppress *par-1(lf)* mutants. These results indicate that functional interaction between *par-1* and *mpk-1* is important for early embryonic development of *C. elegans*.

Several components of the MAP kinase pathway genetically interact with *par-1*: Because MPK-1 functions downstream of a conserved signaling pathway, we

TABLE 2
mpk-1(ga111) restores embryonic viability in *par-1(zu310)* mutants

Genotype	Viability (%)
Wild type	99 ± 1
<i>par-1(zu310)</i>	4 ± 4
<i>unc-79(e1076) mpk-1(ga111)</i>	97 ± 2
<i>unc-79(e1076)</i>	93 ± 2
<i>unc-79(e1076); par-1(zu310)</i>	4 ± 4
<i>unc-79(e1076) mpk-1(ga111); par-1(zu310)</i>	38 ± 9

Values show the average viability of the progeny at 22° as percentage of total progeny ± standard deviation ($n = 9$ plates in three assays). *unc-79(e1068) mpk-1(ga111); par-1(zu310)* exhibits increased viability when compared to *par-1(zu310)* ($P = 3 \times 10^{-8}$) or to *unc-79(e1068); par-1(zu310)* (2×10^{-8}).

sought to determine whether disrupting the function of other components in the MAP kinase pathway, besides *mpk-1*, could increase embryonic viability of *par-1(zu310)* animals. To test this, *par-1(zu310)* mutant animals were treated with dsRNA targeting several components of the MAP kinase pathway. Disrupting the function of the MAP kinase pathway core components *lin-45*, *mek-2*, and *mpk-1* by RNAi resulted in a robust increase in the viability of *par-1(zu310)* mutant embryos (Figure 2B). We also observed modest but significant ($P < 0.05$; $n = 3$) increase in viability when we disrupted the function of *lin-3*, *let-60*, and *ksr-1* by RNAi (Figure 2B). In contrast, RNAi directed against several other components such as *let-23*, *sem-5*, *sos-1*, or *ksr-1* did not alter viability of *par-1(zu310)* mutant embryos to a significant degree in the same assays. While these genes may not impinge on *par-1* function in the early embryo, it is also possible that, in these latter cases, RNAi directed against these genes did

not efficiently abrogate their function. We conclude that knockdown of several genes in the MAP kinase pathway suppresses the embryonic lethal phenotype of the allele *par-1(zu310)*, indicating that *par-1(zu310)* functionally interacts with the MAP kinase signaling pathway during early embryonic development.

Loss of MPK-1 function restores cell division asynchrony in *par-1(zu310)* animals: Reduction of function of the gene *mpk-1* or other genes of the MAP kinase pathway leads to a significant increase in viability in a *par-1(zu310)* background. To address whether this is due to a function for *mpk-1* in early embryogenesis and asymmetric cell division, we examined whether reduction of function of the gene *mpk-1* can restore polarity-dependent processes in *par-1(zu310)* mutant animals.

During the first division of the *C. elegans* embryo, the mitotic spindle is displaced toward the posterior of the embryo, leading to the generation of two daughter cells that differ in size. These two cells subsequently divide asynchronously, with the anterior AB cell dividing ~2 min before the posterior P₁ cell. Mutations in *par-1* result in defects in both of these processes, and blastomeres at the two-cell stage are of more equal size and divide synchronously (KEMPHUES *et al.* 1988). We first determined whether *par-1(zu310)* animals exhibit similar early embryonic defects as other *par-1* mutants when grown at the semi-restrictive temperature of 22°. Quantitative analysis revealed that the anterior cell is significantly smaller in *par-1(zu310)* embryos ($56 \pm 2\%$, $n = 22$) when compared to wild type ($57 \pm 1\%$, $n = 24$, $P = 0.04$) (Figure 3A). This phenotype was not suppressed in *mpk-1(ga111); par-1(zu310)* double mutant embryos ($56 \pm 2\%$, $n = 28$) when compared to *par-1(zu310)* single mutants ($P = 0.96$). This suggests either that loss of function of *mpk-1* cannot restore the cell size asymmetry in *par-1* mutants or, given the expected

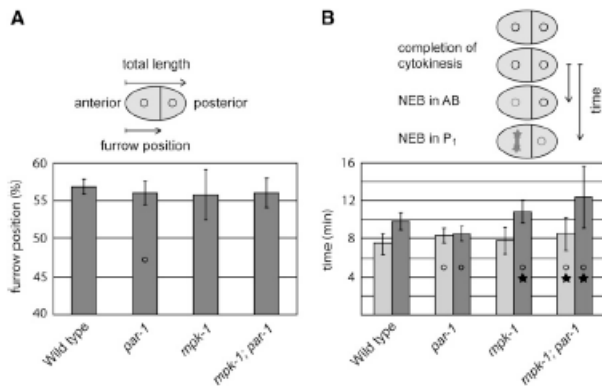


FIGURE 3.—Asymmetric cell division and asynchrony of cell cycle timing in *par-1* and *mpk-1; par-1* mutant embryos. (A) Top panel: Asymmetry in cell division was determined as the size of the AB cell relative to the whole embryo length. For this, the ratio between the distance from the anterior pole to the cleavage furrow and the total length of the embryo was determined at the time of cleavage completion. Bottom panel: The anterior cell in *par-1(zu310)* is significantly smaller than in wild type. *mpk-1(ga111); par-1(zu310)* is not significantly different from *par-1(zu310)*. (B) Top panel: Cell cycle timing was assessed by measuring the time from completion of the first cleavage furrow until nuclear envelope breakdown in the anterior (AB) and posterior (P₁) blastomeres. Bottom panel: Quantification of cell cycle timing in AB (light shading) and P₁ (dark shading) daughter blastomeres. In *par-1(zu310)* both cells divide synchronously as com-

pared to wild type. This phenotype is restored in *mpk-1(ga111); par-1(zu310)* animals. All values shown are averages ± standard deviation ($n \geq 20$). Values that significantly differed ($P < 0.05$) from wild type are marked with a circle, values different from *par-1* are marked with an asterisk.

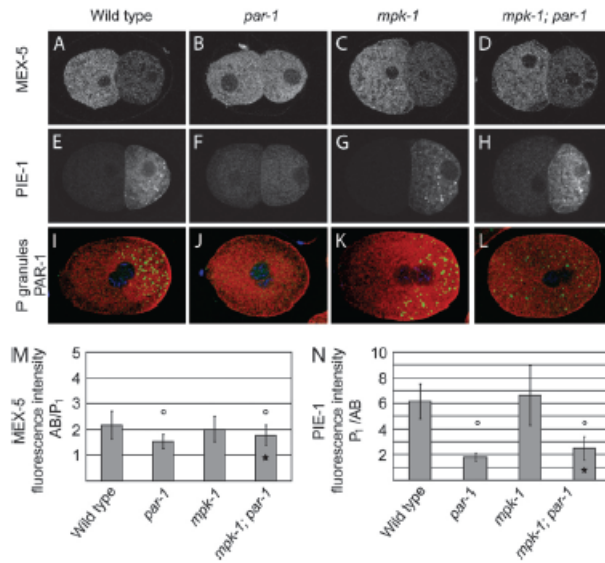


FIGURE 4.—Cell fate specification is partially restored in *mpk-1; par-1* double mutant embryos. (A–L) Localization of endogenous MEX-5 (top panel) and PIE-1 (middle panel) in two-cell stage embryos and localization of PAR-1 (red) and P granules (green) in one-cell stage embryos during centration (bottom panel). Wild-type embryos and *mpk-1* embryos show asymmetric localization of MEX-5, PIE-1, and P granules. *par-1* embryos exhibit a less pronounced gradient of MEX-5 and PIE-1 between the two daughter blastomeres and P granules are absent in one-cell stage embryos. *mpk-1; par-1* animals show partially restored asymmetries for MEX-5 and PIE-1. P granules are present, but not localized to the posterior. Embryo length is ~ 50 μm . (M and N) Quantification of fluorescence intensity ratio between the cytoplasm of AB and P₁ on MEX-5 or PIE-1 stained embryos. Circles indicate values different from wild type and asterisks mark values different from *par-1* mutants ($P < 0.05$).

suppression frequency of 30–40%, that the amount of data acquired was not sufficient to reveal the suppression. However, quantitative analysis of cell division timing at the two-cell stage indicated that *mpk-1(ga111)* can suppress the synchronous division of *par-1(zu310)* mutant embryos at semi-restrictive temperature. In wild-type embryos, nuclear envelope breakdown in the two blastomeres occurs 7:27 min (AB) and 9:45 min (P₁) after the end of the first cytokinesis while both daughter cells divide more synchronously in *par-1(zu310)* embryos (8:25 min and 8:28 min), with AB being slightly slower and P₁ being faster than in wild type (Figure 3B). Interestingly, this phenotype in P₁ was restored in *mpk-1(ga111); par-1(zu310)* in which the AB nucleus broke down at 8:30 min, while P₁ nuclear envelope breakdown occurred only after 12 min, making the division more asynchronous than in wild-type embryos. In this assay, *mpk-1(ga111)* mutants alone behaved more asynchronous than wild type with division timings of 7:48 min (AB) and 10:48 min (P₁), consistent with previously published results, suggesting that reduction of *mpk-1* function by RNAi leads to more asynchronous division (SONNICHSEN *et al.* 2005). However, this effect of *mpk-1* on cell cycle timing is unlikely to be the primary cause of *par-1(zu310)* suppression, as we did not find any correlation between cell cycle timing and *par-1* suppression in the other suppressors identified (data not shown), and slowing down the cell cycle in P₁ by disrupting the function of two unrelated genes (F33H2.5 and *div-1*, Figure S4A) did not suppress *par-1(zu310)* phenotypes (Figure S4, B and C; see below). These results indicate that *mpk-1* can restore the cell cycle timing asynchrony defect of *par-1*

and therefore link *mpk-1* function to one of the PAR protein-dependent features of asymmetric cell division.

Disrupting *mpk-1* function restores cell fate specification in *par-1(zu310)* mutants: PAR-1 is required for the segregation of a number of cell fate determinants along the anteroposterior axis of the one-cell embryo by regulating the anterior localization of MEX-5/6 (SCHUBERT *et al.* 2000; CUENCA *et al.* 2003; TENLEN *et al.* 2008). Consistent with this, we find that MEX-5 localizes to both daughter cells in *par-1(zu310)* embryos at semi-restrictive temperature (Figure 4, A and B). We measured the average ratio of cytoplasmic MEX-5 fluorescence intensity in both blastomeres at the two-cell stage of wild-type embryos and found an enrichment of 2.2 ± 0.5 ($n = 35$) in the anterior blastomere compared to the posterior one. This ratio was reduced to 1.5 ± 0.3 ($n = 35$) in *par-1(zu310)* embryos, a value significantly different from wild type ($P = 10^{-7}$) (Figure 4M). Consistent with previously published data (TENLEN *et al.* 2008), MEX-5 distribution in *mpk-1(ga111)* mutants did not differ significantly from wild-type animals (Figure 4, C and M), even at a fully restrictive temperature for the allele *ga111* (Figure S5), but the MEX-5 fluorescence ratio measured in *mpk-1; par-1* double mutant embryos (1.8 ± 0.4 ; $n = 35$) was significantly higher than in *par-1* embryos ($P = 0.004$) (Figure 4, B, D, and M). However, this fluorescence ratio was still significantly lower than the ratio measured in wild-type embryos ($P = 0.001$). This indicates that disruption of *mpk-1* can partially restore the localization of MEX-5 in *par-1(zu310)* animals and that MPK-1 acts upstream of a mechanism contributing to MEX-5 localization at this stage.

MEX-5 is required to restrict the germline determinant PIE-1 to the posterior of the one-cell embryo and subsequently to the P₁ blastomere at the two-cell stage, leading to a reciprocal pattern of PIE-1 and MEX-5 localization in wild-type embryos (Figures 4, A and E) (SCHUBERT *et al.* 2000). Consistent with the localization pattern of MEX-5, we find that the posterior enrichment of PIE-1 is not as pronounced in *par-1(zu310)* embryos (1.8 ± 3 , $n = 39$) as in wild-type embryos (6.1 ± 1.4 , $n = 39$, $P = 7 \times 10^{-31}$) (Figure 4, E, F, and N). We observed that posterior enrichment of PIE-1 was partially restored in *mpk-1; par-1* double mutants (2.5 ± 0.9) ($n > 38$, $P = 4 \times 10^{-5}$) (Figure 4, E, H, and N). Therefore, reduction of *mpk-1* can partially restore the asymmetric localization of PIE-1 in *par-1* mutant embryos, which is consistent with the restored localization of its upstream localizing factor MEX-5.

We then assessed the localization of P granules, which consist of ribonucleoprotein particles that, as PIE-1, localize to the posterior of the embryo and segregate to germline blastomeres (SEYDOUX and STROME 1999; SCHISA *et al.* 2001). P granules were proposed to be destabilized in the anterior of the embryo by MEX-5/6 activity (SCHUBERT *et al.* 2000) and PAR-1 was suggested to mediate their posterior stabilization by restricting MEX-5/6 at the anterior (CHEEKS *et al.* 2004). Because P granule distribution is highly dynamic during the first mitosis, we scored their localization during prophase, at the time of centration of the nucleo-centrosomal complex. We found that *par-1(zu310)* one-cell embryos are largely devoid of P granules at semi-restrictive temperature, which is consistent with patterns previously reported for other *par-1* alleles: we detected P granules in 24% ($n = 32$) of *par-1(zu310)* mutant embryos while we observed them in 90% ($n = 38$) of the wild-type controls (Figure 4, I and J). Interestingly, we found that 69% ($n = 34$) of *mpk-1; par-1* embryos contained P granules, but that these particles were not restricted to the posterior in most (20/24) of the double mutant one-cell embryos (Figure 4L). This indicates that while *mpk-1* can restore P granule stability in *par-1* mutant one-cell embryos, P granules exhibit an apolar distribution in a *mpk-1(ga111); par-1(zu310)* mutant background, a phenotype that was not observed in either *mpk-1(ga111)* or *par-1(zu310)* single mutant embryos (Figure 4, J, K, and L). This latter phenotype is reminiscent of one-cell embryos lacking the function of *par-1; mex-5; mex-6* (CHEEKS *et al.* 2004), which also show ectopically stabilized, yet symmetrically localized P granules. Interestingly, we found that P granules were restricted to one or two cells in later stage *mpk-1; par-1* double mutant embryos, indicating that *mpk-1* can act to asymmetrically segregate P granules at a later step during embryonic development (data not shown). Taken together, our data show that reduction of function in *mpk-1* restores MEX-5 localization as well as several *mex-5/6*-dependent phenotypes, indicating that *mpk-1* could act through a

regulation of *mex-5* and/or *mex-6* in *par-1(zu310)* mutant embryos (see below).

The localization of P granules and of PIE-1 to posterior cell at one-cell stage is important for the generation of the germline and therefore the fertility of the adult animal. Accordingly, we found that 81% ($n = 136$) of the *par-1(zu310)* animals that escaped embryonic lethality at semi-restrictive temperature developed into sterile adults, having either no visible germline (21%) or exhibiting some cellular material in the body cavity that resembled neither oocytes nor germ cells (60%) and may correspond to the somatic gonad (Figure S6). This data is consistent with the agametic phenotype that was previously described for other alleles of *par-1* (GUO and KEMPHUES 1995). As cell fate specification was partially restored in *mpk-1(ga111); par-1(zu310)* embryos when compared to *par-1(zu310)*, we asked whether fertility was likewise restored. In contrast to *par-1(zu310)* animals, we found that only 31% of the *mpk-1(ga111); par-1(zu310)* double mutant animals that escaped embryonic lethality were sterile ($n = 132$), and most of the animals of this genotype contained both oocytes and embryos in their germline (Figure S6). These data suggest that restoring the asymmetric localization of PIE-1 in early embryos and the enrichment of P granules in germ cell precursors of late *mpk-1; par-1* double mutant embryos is physiologically relevant, as it correlates with increased fertility in the progeny of these double mutants when compared to the progeny of *par-1* animals.

Disrupting specifically MEX-6 function suppresses *par-1(zu310)* lethality: Our finding that *mpk-1* restores several *mex-5/6*-dependent phenotypes in *par-1(zu310)* embryos prompted us to test whether disrupting *mex-5* or *mex-6* by RNAi could suppress *par-1(zu310)* mutants. Because *mex-5* and *mex-6* are partially redundant and share much sequence identity, we specifically disrupted their function using RNAi by targeting unique regions in the genes, as previously described (SCHUBERT *et al.* 2000). Interestingly, we found that while disrupting *mex-5* did not suppress *par-1(zu310)* phenotypes, disruption of *mex-6* suppressed the embryonic lethality of *par-1(zu310)* mutant embryos at the semi-restrictive temperature of 22° (Table 1). It is unclear why this effect is specific to *mex-6*. Since these two genes have partially redundant functions, one possibility is that disrupting *mex-6* can partially compromise, yet not abrogate MEX-5/6 activity, and that this remaining activity is sufficient to ensure normal embryogenesis downstream of PAR-1. Alternatively, we cannot exclude that this may uncover a new, specific function for MEX-6 that would be independent of MEX-5. The finding that RNAi disruption of both *mpk-1* and *mex-6* results in similar effects on *par-1(zu310)* animals is consistent with these genes functioning in the same direction to regulate *par-1*-dependent processes.

***mpk-1* regulates the size of cortical PAR protein domains in the zygote:** Previous studies have reported that while *par-1* is not required for the asymmetric

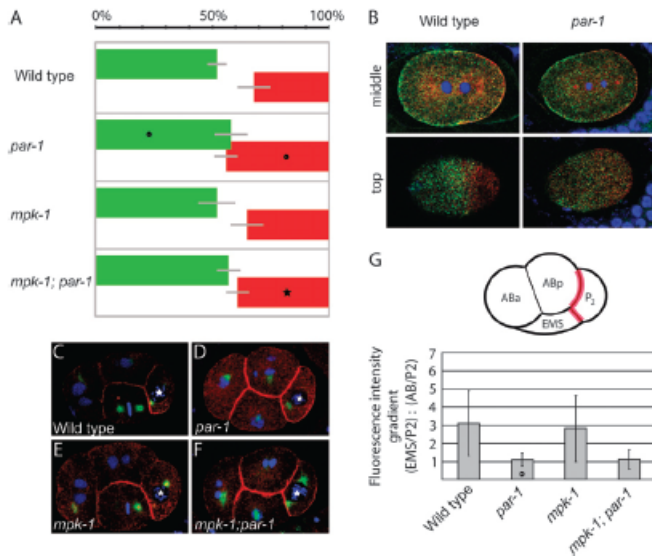


FIGURE 5.—PAR-1 localization in one- and four-cell embryos. (A) Quantification of PAR domain sizes in one-cell embryos stained for either PAR-3 or PAR-1 at anaphase or telophase. PAR-3 domain size (green bars) and PAR-1 domain size (red bars) were determined in independent experiments and are plotted together in a bar diagram for comparison. Zero percent corresponds to the anterior of the embryo, while 100% corresponds to the posterior pole. Values shown correspond to domain size averages \pm standard deviation. Values that are significantly different from wild type are marked with a circle and values significantly different from *par-1* with an asterisk. Both the anterior and the posterior domains are extended in *par-1(zu310)* animals. (B) Confocal images of embryos double stained for both PAR-3 and PAR-1 to visualize domain extension in the same embryos. As for the single-stained embryos quantified in A, the domains of PAR-3 and PAR-1 extend further in *par-1* mutant embryos compared to wild type ($n = 6$). Quantifications were done using mid-plane confocal sections (top panels). (C–G) Dorsoroventral PAR-1 asymmetry is not restored in *mpk-1(ga111); par-1(zu310)* mutant embryos. (C–F) Confocal images of anti-PAR-1 staining (red) of late four-cell stage embryos. Anti-tubulin staining is shown in green, DAPI staining shown in blue. (C, E, and G) In wild-type embryos and in *mpk-1(ga111)* mutants, PAR-1 localizes asymmetrically along the cortex of P_2 (cell marked with an asterisk), with more protein localizing between P_2 /EMS than between P_2 /ABp. (D, F, and G) In *par-1(zu310)* or in *mpk-1(ga111); par-1(zu310)* animals, PAR-1 localizes symmetrically along the dorsoventral axis. Embryo length is $\sim 50 \mu\text{m}$. (G) Top panel: Schematic representation of a four-cell stage embryo. The cortices that were measured for the quantifications shown in the graph below are depicted in red. (G) Bottom panel: Quantification of ratio of the fluorescence intensities along the cortex between P_2 /EMS and the cortex between P_2 /ABp. Values shown correspond to average intensity \pm standard deviation. Values significantly different ($P < 0.05$) from wild type are marked with a circle.

localization of anterior or posterior PAR proteins in the one-cell stage embryo, disrupting its function leads to an expansion of the PAR-2 cortical domain toward the anterior during embryonic polarization (CUENCA *et al.* 2003). This phenotype depends on the activity of MEX-5/6, suggesting a feedback loop that functions during the polarization of the embryo (CUENCA *et al.* 2003). We therefore determined the localization of PAR proteins during the first asymmetric divisions of the *C. elegans* embryo by quantifying the length of cortical PAR protein domains in the middle focal plane of embryos fixed at the anaphase or telophase stages (Figure 5, A and B). In agreement with previous observations on the localization of PAR-2 (CUENCA *et al.* 2003), we found that PAR-1 extends toward the anterior in *par-1(zu310)* mutants: the size of the PAR-1 domain was on average $44 \pm 7\%$ ($n = 22$) of total embryo length in *par-1(zu310)* mutant embryos compared to $32 \pm 4\%$ in wild-type embryos ($n = 22$) ($P = 3 \times 10^{-8}$) (Figure 5, A and B). Disrupting *mpk-1* function could partially suppress this phenotype as the size of the PAR-1 domain in *mpk-1(ga111); par-1(zu310)* embryos was $39 \pm 5\%$ ($n = 23$), which is significantly smaller than in *par-1(zu310)* embryos ($P = 0.01$) (Figure 5A). Interestingly, we also

found that PAR-3 extends toward the posterior in *par-1(zu310)* embryos: the size of the PAR-3 domain was $58 \pm 5\%$ ($n = 22$) of total embryo length in *par-1(zu310)* compared to $52 \pm 7\%$ ($n = 39$) in wild-type animals ($P = 0.004$) (Figure 5, A and B). However, contrary to what was observed with PAR-1, the localization of PAR-3 at the anterior cortex was not restored in *mpk-1(ga111); par-1(zu310)* double mutants when compared to *par-1(zu310)* embryos ($57 \pm 5\%$; $n = 19$; $P = 0.9$) (Figure 5A). In *mpk-1(ga111)* mutant embryos, the domain size of PAR-1 ($35 \pm 8\%$, $n = 13$) or PAR-3 ($52 \pm 7\%$, $n = 19$) did not significantly differ from wild type ($P > 0.5$) (Figure 5A). Our results therefore indicate that the localization of both PAR-1 and PAR-3 is perturbed in *par-1(zu310)* mutant embryos and that the anterior extension of PAR-1, but not the posterior extension of PAR-3, depends on *mpk-1* activity, suggesting that *mpk-1* functions upstream of *par-1* to regulate the localization of posterior PAR proteins.

Following the first division, PAR proteins are required for the asymmetric division of germline blastomeres and adopt polarized distributions in these cells (Guo and KEMPHUES 1995). However, PAR polarity might be differentially established in the one-cell embryo compared

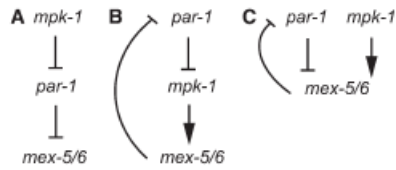


FIGURE 6.—Models depicting possible genetic interactions between *mpk-1* and polarity regulators. *mpk-1* could act upstream of (A), downstream of (B), or parallel to (C) *par-1* to antagonize its function.

to later cells of the P lineage, as genes have been reported to be required for PAR polarity in the two-cell stage, but not in one-cell stage embryos (BASHAM and ROSE 1999). We therefore tested whether *mpk-1* suppresses *par-1* phenotypes at later embryonic stages by determining whether it can restore proper PAR-1 localization in the P₂ blastomere of four-cell stage *par-1(zu310)* mutants. This was assessed by quantifying the fluorescence intensity of PAR-1 along the cortices that P₂ shares with its neighboring blastomeres (Figure 5G, top). We found that the levels of PAR-1 in wild-type four-cell stage embryos are 3.1 ± 0.9 ($n = 42$) higher at the cortex between P₂ and EMS than at the cortex between P₂ and ABp (Figure 5, C and G). This difference was lost in *par-1(zu310)* animals, which displayed a ratio of 1.1 ± 0.4 ($n = 42$; $P = 3 \times 10^{-10}$) (Figure 5, D and G). Interestingly, the asymmetric enrichment of PAR-1 at the P₂/EMS boundary was not restored in *mpk-1(ga111)*; *par-1(zu310)* double mutant embryos, which exhibited a fluorescence ratio of 1.1 ± 0.5 ($n = 38$; $P = 0.9$) and *mpk-1(ga111)* mutants embryos did not differ significantly from wild-type embryos in these assays (2.8 ± 1.8 , $n = 35$, $P = 0.5$) (Figure 5, E–G). We therefore conclude that while disruption of *mpk-1* can restore PAR-1 protein localization in one-cell stage *par-1(zu310)* embryos, it does not modulate PAR-1 protein distribution in later stage embryos.

DISCUSSION

We performed a genome-wide screen for genetic interactors of a *par-1* mutant allele to better define the function of PAR-1 in embryonic polarity. By this approach, we identified six genes that partially but specifically suppress a conditional mutant allele of the gene *par-1*, suggesting that they might act together with *par-1* in fulfilling its functions. According to their molecular nature, the suppressors do not cluster in one prominent pathway, suggesting that they might act via different mechanisms to suppress the *par-1* mutant. One of the genetic interactors of *par-1* identified here is *mpk-1*, a gene encoding MAP kinase. We show that *par-1* is genetically linked to the MAP kinase signaling pathway and that the interaction between *mpk-1* and *par-1* impinges on several aspects of asymmetric cell division.

Taken together, our results provide a novel link between PAR-1 and MAP kinase signaling in the regulation of asymmetric division of the *C. elegans* embryo.

To understand how loss of *mpk-1* function suppresses *par-1*, we analyzed several *par-1* phenotypes in embryos mutant for both *par-1* and *mpk-1*. Importantly, a precise regulation of MAP kinase signaling is required for proper oocyte maturation and embryonic cell fate specification (PAGE *et al.* 2001; KAO *et al.* 2004). Loss of *mpk-1* function in the embryo leads to embryonic lethality and defects in cell cycle timing (KAMATH *et al.* 2003; SIMMER *et al.* 2003; SONNICHSEN *et al.* 2005) indicating that *mpk-1* function is required for oogenesis and embryogenesis. How *mpk-1* fulfills these functions in detail remains to be elucidated. Our analysis shows that in embryos mutant for both *mpk-1* and *par-1*, several polarity phenotypes of *par-1* were partially restored, indicating that *mpk-1* antagonizes *par-1*-dependent signaling in embryonic polarity and thereby links *mpk-1* function to polarity. PAR-1 levels were comparable to wild type in *mpk-1(ga111)*; *par-1(zu310)* embryos, indicating that MPK-1 does not suppress *par-1(zu310)* by regulating its protein levels (Figure S2). Notably, *mpk-1* mutant embryos alone did not exhibit apparent defects in cell fate specification with the exception of cell cycle asynchrony. This suggests that *mpk-1* is not the only negative regulator of *par-1* activity in polarity.

Our data indicate that *mpk-1* impinges on PAR-1 localization in one-cell stage *par-1(zu310)* mutant embryos and that loss of *mpk-1* function cannot bypass the requirement for PAR-1 activity, as asymmetric distribution of MEX-5 was not restored in *mpk-1(ga111)*; *par-1(zu310)* embryos at fully restrictive temperature (data not shown). Interestingly, loss of function of *mpk-1* at semi-restrictive temperature in *par-1(zu310)* animals not only partially restored the asymmetric distribution of MEX-5, but also suppressed several phenotypes that have been reported to depend on the genes *mex-5* and *mex-6*, such as the distribution of PIE-1 or the precise definition of the cortical domains occupied by the posterior PAR proteins at one-cell stage. Moreover, *mpk-1(ga111)*; *par-1(zu310)* mutant embryos exhibited ectopic stabilization and apolar distribution of P granules, a phenotype reminiscent of *mex-6(pk440)*; *mex-5(zu199)*; *par-1(RNAi)* embryos (CHEEKS *et al.* 2004). Taken together, these results support a model in which *mpk-1* could act upstream of *par-1* to impinge on the distribution and/or activity of MEX-5/6 (Figure 6A). As loss of *mpk-1* function does not suppress all of the phenotypes associated with a reduction of PAR-1 function, this model implies that some cellular processes are more sensitive to a reduction in PAR-1 activity. However, our results are also compatible with alternative models in which *mpk-1* would act downstream or parallel of *par-1* (Figure 6, B and C), which would be consistent with previous reports indicating that MPK-1/Erk activation depends on PAR-1/C-TAK1 activity (MULLER *et al.* 2001;

YODER *et al.* 2004). As our results show that *mpk-1* regulates PAR-1 localization, these models would entail that such regulation occurs indirectly via a negative feedback loop through MEX-5/6, which have been reported to control PAR protein localization (SCHUBERT *et al.* 2000; CUENCA *et al.* 2003). Biochemical analysis will be required to resolve the details of this epistatic relationship.

Interestingly, embryos mutant for the E2F and DP transcription factor-related genes *efl-1* and *dpl-1*, which lead to sustained activation of MPK-1 in the *C. elegans* germline, exhibit a Mex (Muscle excess) phenotype reminiscent of mutations in *mex-5* or *mex-6* (PAGE *et al.* 2001). The morphological defects of both *efl-1/dpl-1* and *mex-5* mutants can be partially suppressed by reduction of function of components of the MAP kinase pathway (PAGE *et al.* 2001). In contrast to our results, this indicates that an increase in MAP kinase activity in *efl-1* phenocopies a loss of function of *mex-5/6*, suggesting that *mpk-1* and *mex-5/6* act antagonistically during embryonic development. One possible explanation for this apparent discrepancy between this and our data could be that both gain and loss of function of *mpk-1* have the same phenotypic outcome. Alternatively, a recent study using gene expression profiling proposed that mutations in *mpk-1* and *efl-1/dpl-1* may actually control different target genes in the *C. elegans* germline (LEACOCK and REINKE 2006), suggesting that *mpk-1* and *efl-1* act via different mechanisms. Future identification of additional genes that regulate *mpk-1*- and/or *mex-5/6*-dependent phenotypes will help to address this. Taken together, this indicates that the interplay between MPK-1 activity and MEX-5/6 function is indeed complex and warrants further analysis.

par-1 was previously shown to function genetically antagonistic to MAP kinase signaling during the development of the *C. elegans* vulva (KAO *et al.* 2004; YODER *et al.* 2004) and homolog kinases in other species have been reported to target MAP kinase pathway components (MULLER *et al.* 2001; BENTON and ST JOHNSTON 2003). This antagonistic relationship is consistent with our results that show that reduction of function of *mpk-1* can compensate for the loss of function of *par-1* during embryonic development and it might therefore indicate that the antagonistic behavior of *par-1* and the MAP kinase pathway reflects a conserved mechanism. The core components transmitting MAP kinase signaling are conserved between different cell types and developmental processes in *C. elegans*. While this work highlights a contribution of MAP kinase signaling during asymmetric cell division, it will be of interest to probe the mechanistic relationships between MAP kinase signaling and other pathways controlling cell polarity.

We thank Ken Kemphues for sharing *par-1* mutant strains; Jim Pries and Julie Ahlinger for providing anti-MEX-5, anti-PIE-1, and anti-PAR-1 antibodies; Yuji Kohama for sharing the cDNA encoding *hsv-2*; and to Matthias Peter for generously providing access to the robot unit. We are

grateful to Anne Pacquelet for sharing initial *mex-5/6* suppression data and for insightful advice, to Alexander Schultze for technical help, as well as to Marc Therrien and Christian Rocheleau for comments on the manuscript. We also thank the laboratories of M. Gotta, J.-C. Labbé, A. Hajnal, M. Hengartner, and M. Peter for stimulating discussions. Some of the strains used in this study were provided by the Caenorhabditis Genetics Center, which is funded by the National Institutes of Health. This work was supported by a Boehringer Ingelheim Foundation studentship to A.S., by a Cole Foundation studentship to A.R., by the Canada Research Chair in Cell Division and Differentiation and Canadian Institutes of Health Research grant no. 158715 to J.-C.L., and by funds from Swiss Federal Institute of Technology (ETH) and from the Swiss National Science Foundation to M.G. The Institute of Research in Immunology and Cancer is supported in part by the Canadian Center of Excellence in Commercialization and Research, the Canada Foundation for Innovation, and the Fonds de Recherche en Santé du Québec.

LITERATURE CITED

- BASHAM, S. E., and L. S. ROSE, 1999 Mutations in *ooc-5* and *ooc-3* disrupt oocyte formation and the reestablishment of asymmetric PAR protein localization in two-cell *Caenorhabditis elegans* embryos. *Dev. Biol.* **215**: 253–263.
- BENTON, R., and D. ST JOHNSTON, 2003 *Drosophila* PAR-1 and 14-3-3 inhibit Bazooka/PAR-3 to establish complementary cortical domains in polarized cells. *Cell* **115**: 691–704.
- BOYD, L., S. GUO, D. LEVITAN, D. T. STINGHCOMB and K. J. KEMPHUES, 1996 PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in *C. elegans* embryos. *Development* **122**: 3075–3084.
- BRENNER, S., 1974 The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71–94.
- CERON, J., J. F. RUAL, A. CHANDRA, D. DUPUY, M. VIDAL *et al.*, 2007 Large-scale RNAi screens identify novel genes that interact with the *C. elegans* retinoblastoma pathway as well as splicing-related components with synMuv B activity. *BMC Dev. Biol.* **7**: 30.
- CHEERS, R. J., J. C. CANMAN, W. N. GABRIEL, N. MEYER, S. STROME *et al.*, 2004 *C. elegans* PAR proteins function by mobilizing and stabilizing asymmetrically localized protein complexes. *Curr. Biol.* **14**: 851–862.
- CUENCA, A. A., A. SCHEFFER, D. ACETO, K. KEMPHUES and G. SEYDOUX, 2003 Polarization of the *C. elegans* zygote proceeds via distinct establishment and maintenance phases. *Development* **130**: 1255–1265.
- DERENZO, C., K. J. REESE and G. SEYDOUX, 2003 Exclusion of germ plasm proteins from somatic lineages by cullin-dependent degradation. *Nature* **424**: 685–689.
- DHILLON, A. S., S. HAGAN, O. RATH and W. KOLCH, 2007 MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**: 3279–3290.
- ETEMAD-MOGHADAM, B., S. GUO and K. J. KEMPHUES, 1995 Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos. *Cell* **83**: 743–752.
- FRASER, A. G., R. S. KAMATH, P. ZIPPERLEN, M. MARTINEZ-CAMPOS, M. SOHRMANN *et al.*, 2000 Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**: 325–330.
- GOLSTEIN, B., and S. N. HIRD, 1996 Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **122**: 1467–1474.
- GUO, S., and K. J. KEMPHUES, 1995 *pap-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.
- HAJNAL, A., and T. BERSET, 2002 The *C. elegans* MAPK phosphatase LIP-1 is required for the G(2)/M meiotic arrest of developing oocytes. *EMBO J.* **21**: 4317–4326.
- HAMILL, D. R., A. F. SEVERSON, J. C. CARTER and B. BOWERMAN, 2002 Centrosome maturation and mitotic spindle assembly in *C. elegans* require SPD-5, a protein with multiple coiled-coil domains. *Dev. Cell* **3**: 673–684.
- HAO, Y., L. BOYD and G. SEYDOUX, 2006 Stabilization of cell polarity by the *C. elegans* RING protein PAR-2. *Dev. Cell* **10**: 199–208.

- HUNG, T. J., and K. J. KEMPHUES, 1999 PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* **126**: 127–135.
- IZUMI, Y., T. HIROSE, Y. TAMAI, S. HIRAI, Y. NAGASHIMA *et al.*, 1998 An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *J. Cell Biol.* **143**: 95–106.
- KAMATH, R. S., A. G. FRASER, Y. DONG, G. POULIN, R. DURBIN *et al.*, 2003 Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**: 231–237.
- KAO, G., S. TUCK, D. BAILLIE and M. V. SUNDARAM, 2004 *C. elegans* SUR-6/PR55 cooperates with LET-92/protein phosphatase 2A and promotes Raf activity independently of inhibitory Akt phosphorylation sites. *Development* **131**: 755–765.
- 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.
- KIRBY, C., M. KUSCH and K. KEMPHUES, 1990 Mutations in the par genes of *Caenorhabditis elegans* affect cytoplasmic reorganization during the first cell cycle. *Dev. Biol.* **142**: 203–215.
- LABBÉ, J. C., A. PACQUELET, T. MARTY and M. GOTTA, 2006 A genome-wide screen for suppressors of par-2 uncovers potential regulators of PAR protein-dependent cell polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **174**: 285–295.
- LACKNER, M. R., and S. K. KIM, 1998 Genetic analysis of the *Caenorhabditis elegans* MAP kinase gene *mpk-1*. *Genetics* **150**: 103–117.
- LACKNER, M. R., K. KORNFELD, L. M. MILLER, H. R. HORVITZ and S. K. KIM, 1994 A MAP kinase homolog, *mpk-1*, is involved in ras-mediated induction of vulval cell fates in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* **8**: 160–173.
- LEACOCK, S. W., and V. REINKE, 2006 Expression profiling of MAP kinase-mediated meiotic progression in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* **2**: e174.
- MELLO, C. C., C. SCHUBERT, B. DRAPER, W. ZHANG, R. LOBEL *et al.*, 1996 The PIE-1 protein and germline specification in *C. elegans* embryos. *Nature* **382**: 710–712.
- MULLER, J., S. ORY, T. COPELAND, H. PIWNICA-WORMS and D. K. MORRISON, 2001 GTPase GAP1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol. Cell* **8**: 983–993.
- MUNRO, E., J. NANCE and J. R. PRIESS, 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.
- O'ROURKE, S. M., M. D. DORFMAN, J. C. CARTER and B. BOWERMAN, 2007 Dynein modifiers in *C. elegans*: light chains suppress conditional heavy chain mutants. *PLoS Genet.* **3**: e128.
- PAGE, B. D., S. GUEDES, D. WARING and J. R. PRIESS, 2001 The *C. elegans* E2F- and DP-related proteins are required for embryonic asymmetry and negatively regulate Ras/MAPK signaling. *Mol. Cell* **7**: 451–460.
- PANNEERSELVAM, S., A. MARX, E. M. MANDELKOW and E. MANDELKOW, 2006 Structure of the catalytic and ubiquitin-associated domains of the protein kinase MARK/Pap1. *Structure* **14**: 173–183.
- ROCHELLEAU, C. E., K. CULLISON, K. HUANG, Y. BERNSTEIN, A. C. SPILKER *et al.*, 2008 The *Caenorhabditis elegans* *ekl* (enhancer of *ksr-1* lethality) genes include putative components of a germline small RNA pathway. *Genetics* **178**: 1431–1443.
- RUAL, J. F., N. KLITGORD and G. ACHAZ, 2007 Novel insights into RNAi of target effects using *C. elegans* paralogs. *BMC Genomics* **8**: 106.
- SCHISA, J. A., J. N. PITT and J. R. PRIESS, 2001 Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of *C. elegans* adults. *Development* **128**: 1287–1298.
- SCHLESSINGER, J., 2000 Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**: 211–225.
- SCHUBERT, C. M., R. LIN, C. J. DE VRIES, R. H. PLASTERK and J. R. PRIESS, 2000 MEX-5 and MEX-6 function to establish soma/germline asymmetry in early *C. elegans* embryos. *Mol. Cell* **5**: 671–682.
- SEVERSON, A. F., D. R. HAMILL, J. C. CARTER, J. SCHUMACHER and B. BOWERMAN, 2000 The aurora-related kinase AIR2 recruits ZEN-4/CeMKL1 to the mitotic spindle at metaphase and is required for cytokinesis. *Curr. Biol.* **10**: 1162–1171.
- SEYDOUX, G., C. C. MELLO, J. PETTIT, W. B. WOOD, J. R. PRIESS *et al.*, 1996 Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. *Nature* **382**: 715–716.
- SEYDOUX, G., and S. STROME, 1999 Launching the germline in *Caenorhabditis elegans*: regulation of gene expression in early germ cells. *Development* **126**: 3275–3283.
- SIMMER, E., C. MOORMAN, A. M. VAN DER LINDEN, E. KUIJK, P. V. VAN DEN BERGHE *et al.*, 2003 Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive *n3* strain reveals novel gene functions. *PLoS Biol.* **1**: E12.
- SONNICHSEN, B., L. B. KOSKI, A. WALSH, P. MARSCHELLI, B. NEUMANN *et al.*, 2005 Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **434**: 462–469.
- SULSTON, J. E., E. SCHIERENBERG, J. G. WHITE and J. N. THOMSON, 1983 The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **100**: 64–119.
- SUNDARAM, M. V., 2006 RTK/Ras/MAPK signaling. *WormBook*, Ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.80.1, <http://www.wormbook.org>.
- TABUSE, Y., Y. IZUMI, F. PIANO, K. J. KEMPHUES, J. MIWA *et al.*, 1998 Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **125**: 3607–3614.
- TENENHAUS, C., C. SCHUBERT and G. SEYDOUX, 1998 Genetic requirements for PIE-1 localization and inhibition of gene expression in the embryonic germ lineage of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **200**: 212–224.
- TENLEN, J. R., J. N. MOLK, N. LONDON, B. D. PAGE and J. R. PRIESS, 2008 MEX-5 asymmetry in one-cell *C. elegans* embryos requires PAR-4- and PAR-1-dependent phosphorylation. *Development* **135**: 3665–3675.
- WORMBASE, 2008 Available at <http://www.wormbase.org>; Release WS200, May 16, 2008.
- WU, Y., and M. HAN, 1994 Suppression of activated *Let-60* ras protein defines a role of *Caenorhabditis elegans* *Sur-1* MAP kinase in vulval differentiation. *Genes Dev.* **8**: 147–159.
- YODER, J. H., H. CHONG, K. L. GUAN and M. HAN, 2004 Modulation of KSR activity in *Caenorhabditis elegans* by Zn ions, PAR-1 kinase and PP2A phosphatase. *EMBO J.* **23**: 111–119.

Communicating editor: K. KEMPHUES

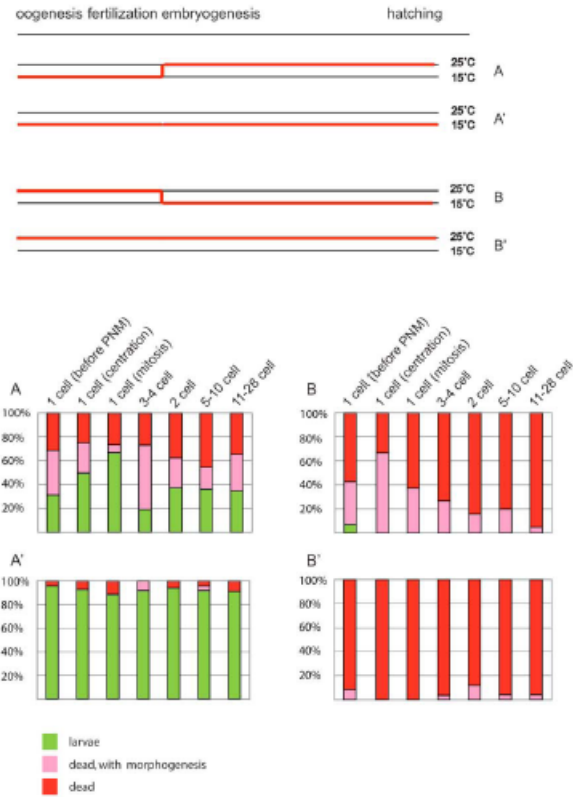


FIGURE S1.—The temperature sensitive period of *par-1(zu310)* starts before the one-cell stage and extends beyond the 28-cell stage. Embryos were dissected from gravid hermaphrodites grown at permissive temperature and shifted to restrictive temperature (or vice versa) at various developmental stages. The shifted embryos were left to develop at the final temperature and their survival was assessed the next day. This analysis revealed that *par-1* requirement in *par-1(zu310)* animals starts before the one-cell stage and ends after an embryonic stage at which 28 nuclei are visible in the middle focal plane of the embryo. Upper panel: Schematic representation of the experiment. Lower panel: Bar graphs representing the percentage of hatching and non-hatching embryos, shifted (or not) at a particular stage (n > 7 for each stage). Morphogenesis was scored by presence or absence of embryo twitching.

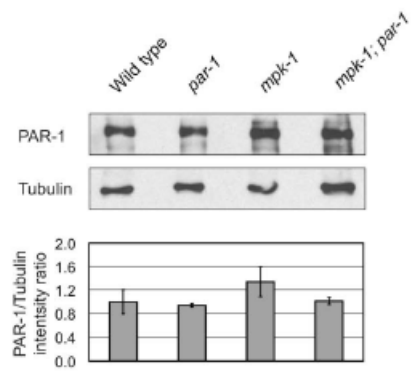


FIGURE S2.—*mpk-1* does not regulate PAR-1 levels. Western blot analysis of PAR-1 protein levels present in embryonic extracts obtained from animals of the indicated genotypes grown at 22°C. The graph shows the relative intensity of PAR-1 levels in various extracts \pm SD in 2 independent experiments and reveals that the levels of PAR-1 are similar in all conditions tested. Tubulin was used as reference.

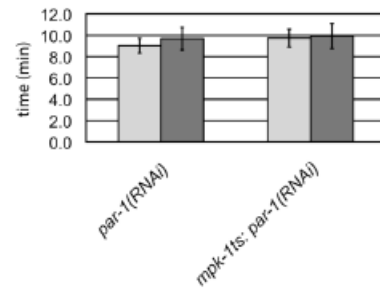


FIGURE S3.—*mpk-1(ga111)* does not suppress a strong loss of *par-1* function. Quantification of cell cycle timing in AB (light grey) and P₁ (dark grey) daughter blastomeres in *par-1(RNAi)* (n=11) or *mpk-1(ga111); par-1(RNAi)* (n=13) embryos. The synchronous cell division phenotype of *par-1(RNAi)* 2-cell stage embryos is not suppressed by *mpk-1(ga111)*.

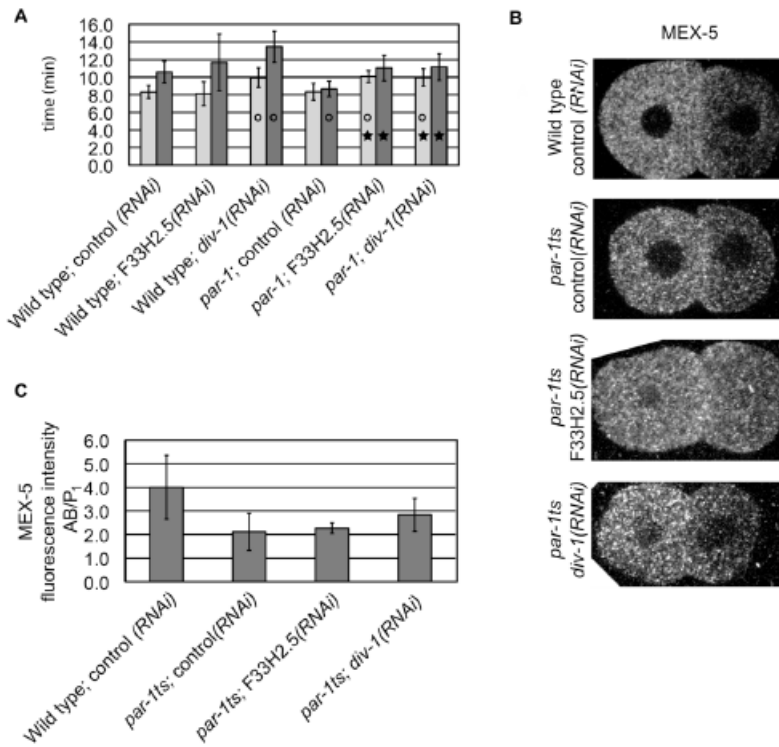


FIGURE S4.—Slowing down the cell cycle does not result in suppression of *par-1(zu310)*. (A) Quantification of cell cycle timing in AB (light grey) and P₁ (dark grey) daughter blastomeres in control (n=9), *F33H2.5(RNAi)* (n=10) or *div-1(RNAi)* (n=10) embryos. Cell cycle timing of both AB and P₁ in *div-1(RNAi)* embryos was significantly different from the control ($p < 0.05$). The division of P₁ in *F33H2.5(RNAi)* embryos was slightly slower than control, however this was not significant. (B) Localization of endogenous MEX-5 in two-cell stage embryos at 22°C. While wild-type embryos show asymmetric localization of MEX-5, *par-1* mutant embryos exhibit a less pronounced gradient of MEX-5 between the two daughter blastomeres. MEX-5 localization was not restored by RNAi depletion of *F33H2.5* or *div-1*. Embryo length is ~50 μm . (C) Quantification of fluorescence intensity ratio between the cytoplasm of AB and P₁ on MEX-5 stained embryos. The number of embryos analyzed ranges between 5 and 7.

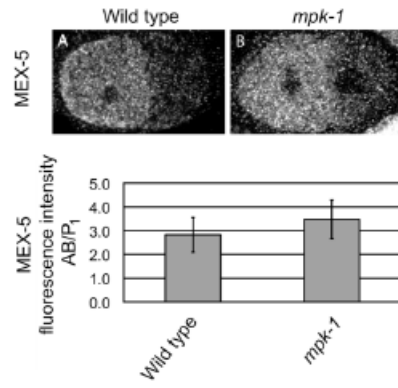


FIGURE S5.—A strong loss of *mpk-1* function does not affect MEX-5 levels. The images show localization of endogenous MEX-5 in two-cell stage embryos. Quantification revealed that MEX-5 is localized asymmetrically in both wild-type ($n=4$) and *mpk-1(ga111)* ($n=7$) embryos grown at 25°C. Embryo length is ~ 50 μm .

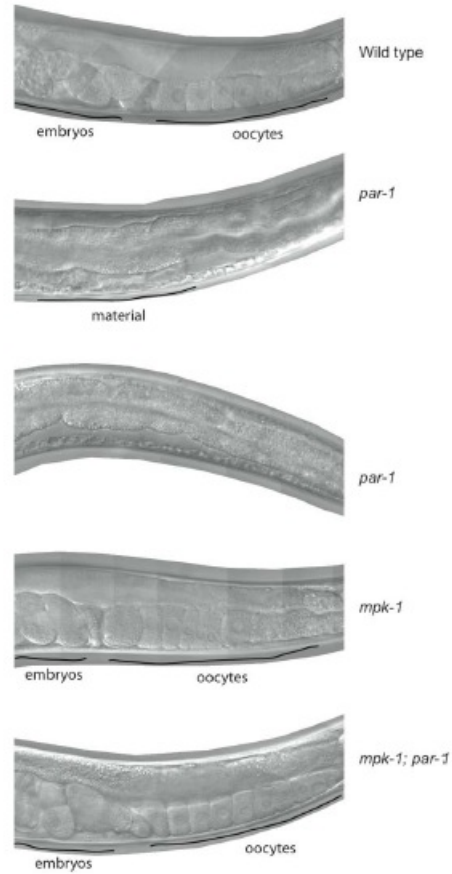


FIGURE S6.—Fertility of *mpk-1; par-1* double mutant F1 progeny is partially restored. DIC images of the posterior of F1 animals at 24hs post larval stage L4. Posterior is right and ventral down in all images. In wild-type, *mpk-1* and *mpk-1; par-1* animals embryos and oocytes are visible ventrally. In *par-1* animals either only gut is visible in the body cavity (lower image) or gut and some cellular material is present. The cellular material is reminiscent of the somatic part of the gonad.

TABLE S1
Candidate Suppressors of *par-1(zu310)*

M01D7.7	C16C4.1	T21B4.1	T20G5.6
C32E8.4	R52.10	Y54G9A.2	Y39A1C.2
T03F1.2	D2062.9	Y54G9A.5	Y56A3A.29
C18E3.6	Y27F2A.g	F26H11.3	Y49E10.25
T03A1.3	F14D2.3	Y46G5.ee	F53A2.1
ZK973.f	Y49F6C.7	Y46G5.kk	F53A2.6
F21F3.5	F12E12.i	C29F9.2	C51G7.d
C46H11.10	C17A2.8	T24C4.1	Y119D3_457.b
C32E12.4	B0286.4	F23H11.3	Y119D3_465.y
F48C1.3	T05C1.5	R06B10.2	Y53G8A_9248.d
F26B1.7	C34F11.3	T20H9.4	Y55B1A_116.a
C55B7.2	C34F11.5	W04B5.4	Y71H2_385.b
D2092.5	F56D1.3	E02H9.7	F29C4.2
T23B3.5	H12I13.c	C44B11.1	F18F11.4
T21G5.5	T23D10.2	M01F1.3	Y55F3C.b
K07G5.3	C18H9.8	C44F1.5	W09G12.9
C15A11.2	T14B4.2	F43C1.2	F42A6.1
D2030.4	F10E7.6	F35G12.10	Y37E11B.5
F02E9.5	K02A2.6	C35D10.6	F47C12.10
C36B1.1	F35D2.1	C35D10.7	W03B1.3
F36A2.7	C06A8.8	W03A5.7	Y24D9A.c
F25H5.5	T05A6.2	B0244.4	F41H10.1
Y106G6A.3	C41C4.6	C28H8.6	F41H10.5
Y106G6D.3	T22C8.4	T12A2.13	Y4C6A.k
C34B2.8	F07H5.8	C56G2.3	C55C3.3
C35E7.9	T24H10.3	C05D11.10	K02B2.2
F56H6.4	W07A12.6	F27B3.5	K02B2.4
K11D2.4	T19H5.1	F20H11.6	C49A9.3
C49A1.8	R134.2	F37C12.3	C49A9.5
Y105E8C.o	T01E8.6	B0361.4	T13A10.11
Y105E8D.c	C07E3.4	F56C9.3	Y73B6A.h
Y47G6A_247.h	F59B10.6	T20B12.2	T05A12.4
Y48G8A_3945.b	C09G5.6	C07H6.7	T22D1.11
W10D9.1	F44F4.5	D2007.5	C34D4.14
C08G5.4	R03D7.6	F10E9.4	C50F7.6
T07D3.2	T06D8.5	B0303.15	C09G4.2
R07C3.10	T24F1.5	F59B2.11	C49C8.5
F45D11.s	ZK930.2	K04H4.6	D1046.1
T23F4.3	Y17G7B.18a	B0464.8	C53B4.8
F45C12.5	C50E10.7	M04D8.5	C53D6.5
F44D12.5	T28A11.4	Y116F11A.s	C23H4.3
F01G10.3	T20D4.3	F46B3.5	C23H4.5
Y43C5B.1	H10D18.c	T03D8.1	K03A11.1
Y69E1A.2	K03B4.2	Y57E12_245.a	F28H6.2

F01G4.2	K03B4.4	Y61A9LA_70.a	T20F7.7
M04B2.2	C13D9.6	Y61A9LA_72.d	F11C7.3
F58B3.4	C13D9.9	Y97E10A_260.a	
ZK617.1	ZC317.4	Y97E10A_262.a	
T12G3.2	CD4.3	ZK1193.2	
C42C1.7	K09H11.2	F13C5.1	
T23F6.2	C04E6.11	Y9C12A.b	
F07C6.3	R01B10.1	C02H7.2	
M02B1.2	W01A11.5	K06A9.3	
C32H11.5	EGAP9.2	F07G6.3	
C32H11.13	T10H9.1	F31A9.4	
F49E11.3	T01C4.4	T26C11.5	
F49E11.4	C05C8.1	Y59E1A.b	
Y45F10C.4	C03G6.13	AH9.2	
Y37A1C.1	C54F6.10	C33D12.3	
Y41E3.10	Y50E8.n	F40F4.2	
Y105C5A.n	Y50E8.p	C16B8.3	
F26D10.8	C23D7.1	R08E3.3	
F26D10.10	C01G10.2	F14D12.5	
C06A12.3	C01G10.6	C41G11.1	
Y37E11A_94.b	C01G10.13	C46F4.1	
Y38F2A_6126.h	K08F9.4	K04E7.2	
Y55F3A_748.f	C41G6.6	R03E9.4	
Y69A2A_2109.b	B0391.5	C02B8.5	
Y69A2A_2991.c	Y6E2A.1	R09F10.4	
Y69A2A_7278.j	F36G9.8	H03E18.1	
W03F9.6	F11A5.12	F47E1.2	
ZK6.8	F36D9.9	C43C3.1	
F31F4.5	F47H4.4	F21G4.6	
F31F4.6	T27C5.1	F19C6.1	
C46H4.10	C38D9.4	T06H11.1	
C46H4.15	F57G4.1	F41E7.6	
Y19D10A.i	F59A1.9	R07E3.4	
Y19D10A.o	F11D11.8	F47B10.5	
F56A4.g	F21D9.4	W04G3.7	
K08D9.1	Y116F11A.f	F13D2.4	

List of the GenePair names of the 286 bacterial clones that lead to increased survival of the progeny of *par-1(zu310)* mutant animals in two independent liquid assays. Please note that the identity of these clones has not been verified by PCR.

TABLE S2

***mpk-1(ga111)* does not restore viability of *par-1(zu310)* mutants at restrictive temperature**

genotype	viability (%)
Wild type	100±1
<i>par-1(zu310)</i>	0±0
<i>unc-79(t1076) mpk-1(ga111)</i>	73±21
<i>unc-79(t1076)</i>	94±6
<i>unc-79(t1076); par-1(zu310)</i>	5±8
<i>unc-79(t1076); par-1(zu310)</i>	2±4
<i>unc-79(t1076) mpk-1(ga111); par-1(zu310)</i>	0±0
<i>unc-79(t1076) mpk-1(ga111); par-1(zu310)</i>	0±0
<i>unc-79(t1076) mpk-1(ga111); par-1(zu310)</i>	0±0

mpk-1(ga111) does not significantly increase viability in a *par-1(zu310)* mutant background at 25°C. Values show the average viability of their progeny at 25°C as percentage of total progeny ± standard deviation (n=3 plates, one assay). Three independent lines of the genotype *unc-79(t1068) mpk-1(ga111); par-1(zu310)* and two independent lines of the genotype *unc-79(t1068); par-1(zu310)* were analyzed and did not show a significant increase in viability when compared to either *par-1(zu310)* or *unc-79(t1068); par-1(zu310)* mutant backgrounds ($p \geq 0.05$).