

Université de Montréal

Protection à long terme du système nerveux : étude de facteurs extrinsèques chez *C. elegans*

Par

Marie Biard

Département de neurosciences, Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès science en neurosciences

Août 2021

© Marie Biard, 2021

Université de Montréal

Département de neurosciences, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

Protection à long terme du système nerveux : étude de facteurs extrinsèques chez *C. elegans*

Présenté par

Marie Biard

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Ravi Rungta

Président-rapporteur

Alex Parker

Directeur de recherche

Claire Bénard

Codirectrice de recherche

Jean-Claude Labbé

Membre du jury

Résumé

Tout au long de la vie d'un organisme, l'architecture du système nerveux est mise à l'épreuve par des processus de maturation, de croissance, de stress mécaniques et de vieillissement. Bien que certaines molécules de maintenance de l'organisation des ganglions et fascicules neuronaux aient été identifiés chez le nématode *C. elegans*, les mécanismes assurant la protection à long terme de l'architecture du système nerveux restent mal compris.

Chez les mutants de maintenance neuronale *sax-7/L1CAM*, certaines structures neuronales se développent initialement normalement, mais se désorganisent avec le temps. Un criblage génétique effectué au laboratoire a indiqué l'implication du gène *mig-6/Papiline* dans la maintenance neuronale: la perte de fonction de *mig-6* supprime la désorganisation neuronale progressive des mutants *sax-7*. De plus, l'organisation neuronale des mutants *mig-6* est mieux préservée dans un contexte de stress mécanique que chez le type sauvage. Un équilibre entre l'adhésion cellulaire et la flexibilité du milieu semble donc clé. Par ailleurs, les cellules gliales sont en relation étroite avec les neurones, mais leur implication dans la maintenance neuronale reste inexplorée.

Ainsi, lors de ces travaux, la question principale est d'étudier la contribution de la matrice extracellulaire et de cellules gliales dans un contexte de maintenance de l'architecture du système nerveux chez *C. elegans*. Les résultats révèlent que MIG-6/Papiline régule l'état de la matrice extracellulaire en modifiant l'organisation du collagène IV, un composant abondant et conservé des membranes basales. Cette modification du collagène IV semble compenser les défauts d'adhésion cellulaire présents chez les mutants de maintenance *sax-7/L1CAM* et contrer un déplacement des ganglions neuronaux lors d'un stress mécanique accru. L'exploration de cellules gliales en contexte de maintenance neuronale a mis en évidence certains défauts des mutants de maintenance *sax-7/L1CAM*. Comprendre les principes généraux du maintien de l'architecture et de la connectivité neuronale pourrait aider à identifier des facteurs clés influençant l'apparition et la progression de neuropathologies.

Mots-clés : maintenance neuronale, système nerveux, matrice extracellulaire, cellules gliales, *C. elegans*.

Abstract

Throughout life, the architecture of the nervous system is challenged by processes of maturation, growth, mechanical stress and aging. Although neuronal maintenance mechanisms of ganglia and fascicles organization involving conserved factors have been identified in the nematode *C. elegans*, little is known about processes that aim for the long-term protection of the nervous system architecture.

In *sax-7/L1CAM* neuronal maintenance mutants, some neuronal ganglia and fascicles initially develop normally, but become disorganized over time. A genetic screen performed in the laboratory indicated the involvement of *mig-6/Papilin* in neuronal maintenance: loss of *mig-6* function suppresses progressive neuronal disorganization in *sax-7* mutants. Moreover, the neuronal organization of *mig-6* mutants is better preserved under mechanical stress than in the wild-type strain. A balance between the adhesion of neurons to their environment and the flexibility of the surrounding extracellular matrix thus seems of importance. Furthermore, glial cells are closely related to neurons, but their involvement in the maintenance of the organization of neuronal structures remains unexplored.

The main question of this work is to study the contribution of the extracellular matrix and of two types of glial cells in the context of maintenance of the nervous system architecture in *C. elegans*. Our results reveal that *MIG-6/Papilin* regulates the state of the extracellular matrix by altering the organization of collagen IV, an abundant and conserved component of basement membranes, thus compensating for cell adhesion defects in *sax-7/L1CAM* maintenance mutants and counteracting a neural ganglia displacement upon increased mechanical stress. Our exploration of glial cells in the context of neuronal maintenance also revealed defects in *sax-7/L1CAM* maintenance mutants. Understanding the general principles of maintenance of neuronal architecture and connectivity could help identify key factors influencing the onset and progression of neuropathologies.

Keywords : neuronal maintenance, nervous system, extracellular matrix, glial cells, *C. elegans*.

Table des matières

Résumé.....	5
Abstract	7
Table des matières.....	9
Liste des tableaux.....	15
Liste des figures	17
Liste des abréviations.....	19
Remerciements.....	23
CHAPITRE 1 – Introduction générale.....	25
1.1 Maintenance de l’architecture du système nerveux : généralités.....	26
1.1.1 Défis rencontrés : de la croissance au vieillissement.....	26
1.1.2 Importance de la recherche sur la maintenance neuronale	27
1.2 <i>C. elegans</i> comme modèle d’étude	28
1.2.1 Émergence du nématode comme organisme modèle.....	28
1.2.2 Avantages.....	29
1.2.3 Le système nerveux du <i>C. elegans</i>	31
1.3 Maintenance du système nerveux chez <i>C. elegans</i>	35
1.3.1 Facteurs de maintenance des propriétés neuronales	36
1.3.1.1 Morphologie.....	36
1.3.1.2 Fonction	37
1.3.2 Facteurs de maintenance d’ensembles neuronaux	38
1.3.2.1 Maintenance des fascicules.....	39
1.3.2.2 Maintenance des ganglions et fascicules	39
1.5 Axes de l’étude	41

CHAPITRE 2 – Rôle de la matrice extracellulaire dans la maintenance neuronale.....	43
2.1 Introduction.....	44
2.1.1 Crible génétique d’identification de supresseurs de défauts de maintenance neuronaux <i>sax-7/L1CAM</i>	44
2.1.2 MIG-6/Papiline : une protéine conservée de la matrice extracellulaire.....	44
2.1.3 La matrice extracellulaire	46
2.1.4 Interaction génétique entre <i>mig-6</i> /Papiline et <i>emb-9</i> /Collagène IV.....	47
2.1.4 Hypothèses.....	47
2.1.5 Objectifs.....	48
2.1.5.1 Caractériser l’état de la matrice extracellulaire chez les mutants <i>mig-6</i>	48
2.1.5.2 Investiguer l’organisation neuronale des mutants <i>mig-6</i> en condition de stress mécanique	48
2.2 Matériel et méthodes.....	50
2.2.1 Maintien des souches	50
2.2.2 Microscopie.....	51
2.2.3 Croissance synchronisée en culture liquide	51
2.2.4 ARNi en culture liquide	52
-3 jours – Préparation des bactéries	52
-2 jours – Préparation des bactéries	52
-1 jour – Préparation des bactéries et synchronisation des vers.....	53
Jour 0 – Préparation et ajout des bactéries aux cultures liquides.....	53
Jour 3 – Ajout de bactéries aux cultures liquides	53
Jour 5 – Observation	53
2.2.5 ARNi en culture solide.....	53
2.2.6 Analyses neuroanatomiques.....	54
Position des corps cellulaires des neurones ASH et ASI.....	54

2.2.7 Analyses du collagène IV	54
Quantification des structures fibrotiques	54
Quantification d'intensité de fluorescence totale.....	54
2.2.8 Analyses statistiques	55
2.3 Résultats.....	55
2.3.1 Altération de la matrice extracellulaire chez les mutants <i>mig-6</i>	55
2.3.2 Déplétion du collagène IV chez les mutants <i>mig-6</i>	57
2.3.3 Impact d'un stress mécanique accru sur l'organisation neuronale	58
2.3.4 Déplétion du collagène IV en condition de stress mécanique	60
2.3.5 Impact du stress mécanique sur les défauts de maintenance <i>sax-7</i>	62
2.4 Discussion.....	64
2.4.1 Interacteurs de <i>mig-6</i> pour supprimer les défauts neuronaux	65
2.4.1.1 Interacteurs génétiques connus pour la maintenance neuronale	65
<i>mig-17</i> /ADAMTS	65
<i>pxn-2</i> /Peroxydase.....	66
2.4.1.2 Interacteurs potentiels à investiguer.....	67
<i>ost-1</i> /SPARC.....	67
<i>gon-1</i> /ADAMTS-9 -20.....	67
2.4.2 Quelle importance pour la cassette papilaine?.....	68
2.4.3 Conséquences d'une croissance en milieu liquide.....	69
2.4.3.1 Induction d'un stress mécanique important	69
2.4.3.2 Altération de l'architecture neuronale	70
2.4.3.3 Impact sur la distribution du collagène IV.....	70
2.4.4 Remodelage de la matrice extracellulaire : plasticité et élasticité	71

CHAPITRE 3 – Exploration des cellules gliales dans un contexte de maintenance	76
3.1 Introduction.....	77
3.1.2 Les GLR : des cellules gliales tapissant l’intérieur du neuropile.....	77
3.1.3 Les CEPsh : des cellules gliales recouvrant le neuropile.....	78
3.1.4 Objectifs.....	79
3.1.4.1 Générer les outils nécessaires à l’étude des cellules gliales en contexte de maintenance du système nerveux.....	79
3.1.4.2 Explorer l’impact d’une perturbation post-développementale des cellules gliales	79
3.1.4.3 Caractériser la morphologie gliale chez le type sauvage ainsi que chez les mutants de maintenance <i>sax-7</i>	79
3.2 Matériel et méthodes.....	80
3.2.1 Maintien des souches	80
3.2.1 Clonages.....	81
Visualisation des GLR	83
Visualisation des CEPsh	83
Perturbation des GLR	84
Perturbation des CEPsh.....	84
3.2.2 Micro-injections et génération de lignées transgéniques	84
3.2.3 Intégration de plasmides extra-chromosomaux	84
3.2.4 Microscopie.....	85
3.2.5 Analyse morphologique des cellules gliales	85
Caractérisation des GLR.....	85
Caractérisation des CEPsh	86
3.2.6 Marquage de neurones sensoriels par coloration lipophile.....	86
3.2.7 Perturbation cellulaire par optogénétique	86
3.2.8 Analyses statistiques	87

3.3 Résultats	87
3.3.1 Caractérisation morphologique des GLR chez le type sauvage.....	87
3.3.2 Caractérisation morphologique des CEPsh chez le type sauvage.....	90
3.3.3 Perturbation post-développementale des GLR	92
3.3.4 Perturbation post-développementale des CEPsh	94
3.3.5 Observation des GLR chez les mutants de maintenance <i>sax-7</i>	96
3.3.5 Observation des CEPsh chez les mutants de maintenance <i>sax-7</i>	98
3.4 Discussion	100
3.4.1 Inefficacité de <i>miniSOG</i> exprimée dans les GLR	101
3.4.1.1 Piste de solution : suivre et augmenter l'expression de <i>miniSOG</i>	102
3.4.1.2 Piste de solution : modification du protocole d'illumination.....	102
3.4.2 Contrôle temporel problématique de la perturbation des CEPsh.....	103
3.4.2.1 Piste de solution : suivre et diminuer l'expression de <i>miniSOG</i>	104
3.4.2.2 Piste de solution : obtenir une souche d'expression stable de <i>miniSOG</i>	104
3.4.3 Altération des GLR chez les mutants <i>sax-7</i>	104
3.4.3.1 Diminution de l'intensité de fluorescence	104
3.4.3.2 Raccourcissement des prolongements en feuille	105
3.4.3.3 Défaut de positionnement dans l'axe antéro-postérieur.....	105
3.4.4 Altération des CEPsh chez les mutants <i>sax-7</i>	106
3.4.4.1 Relâche de vésicules membranaires.....	106
3.4.4.2 Défaut de recouvrement du neuropile.....	106
3.4.5 Perspectives.....	107
3.4.5.1 Valider la présence de SAX-7 dans les cellules gliales à l'âge adulte.....	107
3.4.5.2 Effectuer des expériences de sauvetage des défauts gliaux	108
3.4.5.3 Déterminer l'impact d'une déplétion post-développementale de SAX-7	108

CHAPITRE 4 – Discussion générale et conclusion.....	110
4.1 Récapitulatif des résultats	111
4.2 Perspectives : faire le pont entre les deux axes du projet	112
4.3 Retombées des travaux	113
4.3.1 Identification de mécanismes conservés chez l’humain	113
4.3.1.1 En contexte physiologique.....	113
4.3.1.2 En contexte pathologique.....	114
4.3.2 Potentiel thérapeutique.....	115
4.4 Conclusion	115
Références bibliographiques.....	117
CHAPITRE 5 - Annexes.....	137
5.1 Autres méthodes de quantification des structures fibrotiques	137
5.2 Essai de l’approche <i>miniSOG</i> en utilisant le microscope à fluorescence <i>Imager M2</i> comme source lumineuse.....	141

Liste des tableaux

Tableau 1. – Liste des allèles utilisés pour l’axe I.....	50
Tableau 2. – Liste des souches utilisées pour l’axe I.....	50
Tableau 3. – Liste des souches utilisées pour l’axe II.	80
Tableau 4. – Liste des amorces utilisées pour l’axe II.....	82
Tableau 5. – Liste des plasmides utilisés pour l’axe II.....	83
Tableau 6. – Résumé des essais de la perturbation des GLR par <i>miniSOG</i>	93
Tableau 7. – Résumé des essais de perturbation des CEPsh par <i>miniSOG</i>	96
Tableau 8. – Tentatives de perturbations des CEPsh avec le microscope à fluorescence <i>Imager M2</i> comme source lumineuse.....	141

Liste des figures

Figure 1. –	Le <i>C. elegans</i> hermaphrodite.	28
Figure 2. –	Schématisation du cycle de vie du <i>C. elegans</i> à 22°C.	30
Figure 3. –	L'organisation du système nerveux du <i>C. elegans</i>	32
Figure 4. –	Les cellules gliales du <i>C. elegans</i>	33
Figure 5. –	Le nématode comme modèle d'étude de la maintenance neuronale.	35
Figure 6. –	Facteurs de maintenance neuronale identifiés chez <i>C. elegans</i>	38
Figure 7. –	Exemple de défauts de maintenance neuronale.	40
Figure 8. –	Présentation des axes de l'étude.	42
Figure 9. –	Identification d'un suppresseur des défauts de maintenance neuronale <i>sax-7</i> par le laboratoire Bénard.	45
Figure 10. –	Principaux composants des membranes basales.	47
Figure 11. –	Hypothèse de travail : l'équilibre entre les forces d'adhésion cellulaire et la flexibilité de la matrice extracellulaire assurerait la maintenance neuronale.	49
Figure 12. –	Résumé des expériences en condition de stress mécanique.	52
Figure 14. –	La présence de structures fibrotiques chez les mutants <i>mig-6</i> dépend des niveaux de collagène IV	58
Figure 15. –	Impact d'un stress mécanique sur l'organisation neuronale.	59
Figure 16. –	Les niveaux de collagène IV sont importants pour prévenir le déplacement neuronal en culture liquide.	61
Figure 17. –	Observation des structures neuronales des mutants <i>sax-7</i> en culture liquide.	63
Figure 18. –	Résumé du modèle intégrant des concepts de biomécanique.	74
Figure 19. –	Schématisation des cellules gliales à l'étude.	78
Figure 20. –	Exemple de mesures des prolongements cytoplasmiques en feuille des GLR chez le type sauvage.	85
Figure 21. –	L'approche <i>miniSOG</i> de perturbation des cellules gliales.	87
Figure 22. –	Caractérisation morphologique des GLR chez le type sauvage.	89
Figure 23. –	Caractérisation morphologique des CEPsh chez le type sauvage.	91
Figure 24. –	Perturbation des GLR par <i>miniSOG</i> au 4 ^e stade larvaire.	93
Figure 25. –	Perturbation des CEPsh par <i>miniSOG</i> au 4 ^e stade larvaire.	95

Figure 26. – Les mutants de maintenance <i>sax-7</i> présentent des défauts morphologiques des GLR.....	97
Figure 27. – Les mutants de maintenance <i>sax-7</i> présentent des défauts morphologiques des CEPsh.....	99
Figure 28. – Schématisation de l’approche Dégron inductible par l’auxine (AID).	109
Figure 29. – Description de la méthode des critères.	138
Figure 30. – Description de la méthode des seuils.	139
Figure 31. – Comparaison de la méthode du seuil avec la détection humaine de structures fibrotiques.....	140

Liste des abréviations

ADAMTS : *A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin motifs*

AID : *Auxin Inductible Degron*

AMsh : *Amphid SHeath*

ARNi : *Acide RiboNucléique Interférence*

C. elegans : *Caenorhabditis elegans*

CEPsh : *Cephalic SHeath*

CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

DiI : *1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylIndocarbocyanine perchlorate*

DiO : *3,3'-DioctadecylOxocarbocyanine perchlorate*

E. coli OP50 : *Escherichia coli* de souche OP50

EMS : *Ethyl MethaneSulfonate*

GFP : *Green Fluorescent Protein*

GLR: *Glia-Like cell of the nerve Ring*

IPTG : *IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside*

L1CAM : *L1 Cell Adhesion Molecule*

L1 : 1^{er} stade larvaire

L2 : 2^e stade larvaire

L3 : 3^e stade larvaire

L4 : 4^e stade larvaire

miniSOG : *mini Singlet Oxygen Generator*

NGM : *Nematode Growth Medium*

pb: paire de base

PH : *Pleckstrine Homology domain*

SPARC: *Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*

*À Mathilde,
la meilleure sœur au monde*

Remerciements

Avant tout, je remercie chaleureusement mes directeurs de maîtrise, les professeurs Claire Bénard et Alex Parker. Merci Claire de m'avoir accueillie au sein de ta merveilleuse équipe et de m'avoir soutenue, encouragée et guidée tout au long de mon parcours académique, tant au baccalauréat qu'à la maîtrise. Tu m'as fait découvrir la recherche en prenant toujours le temps qu'il faut pour partager tes connaissances me semblant infinies avec l'approche humaine qui t'es propre. C'est un grand privilège d'avoir reçu un tel encadrement de la part d'une si grande chercheuse, me poussant toujours à donner le meilleur de moi-même et sans lequel la complétion de cette maîtrise n'aurait eu lieu. Merci encore pour toutes les opportunités, les enseignements et la confiance que tu m'as accordés, je t'en serai éternellement reconnaissante.

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude à notre incroyable responsable de recherche Lise Rivollet pour sa patience inépuisable... un nom de souche à la fois. Merci d'avoir été là pour m'enseigner, pour me conseiller et pour toutes tes précieuses réflexions ayant permis l'avancée de ce projet. C'était un réel plaisir d'entrer au laboratoire chaque matin grâce à toi.

Merci à tous les membres du laboratoire Bénard qui participent à entretenir un environnement de travail agréable et motivant. Merci pour votre soutien et votre bonne humeur, je garderai de merveilleux souvenirs de mon passage parmi vous. Merci plus particulièrement à Malika Nadour, source constante de créativité, qui m'a prise sous son aile et intégrée à ses travaux lors de mon tout premier stage. Merci à Philippe St-Louis, notre micro-injecteur favori, pour ta grande contribution à la génération des lignées transgéniques lors de ces travaux de maîtrise. Merci à Valérie Fontaine pour ton soutien durant cette période intense de rédaction et à Élise Cheynet pour les bons moments passés ensemble et pour toutes nos discussions pendant et après ton passage à Montréal.

Merci à mes chères collègues de maîtrise, Alice et Ife, rencontrées malgré les cours sur *zoom* et avec qui j'ai pu partager des périodes d'étude et de travail stimulantes.

J'exprime aussi ma reconnaissance au Département de neurosciences de l'Université de Montréal pour l'octroi d'une Bourse de recrutement et aux professeurs pour l'enseignement de qualité que j'ai pu recevoir, particulièrement au professeur Alex Parker qui a su piquer ma curiosité

pour ce petit organisme qu'est le *C. elegans*. Merci au professeur Michael Hendricks (Université McGill) pour avoir accordé de son temps afin de construire une source lumineuse nécessaire à l'aboutissement d'une partie du projet, aux membres de mon comité de parrainage composé de mes directeurs de maîtrise et des professeurs Artur Kania et Adriana Di Polo pour tout le temps accordé au suivi de mon projet, ainsi qu'aux membres du présent jury allant évaluer le fruit de mes travaux de maîtrise.

Enfin, je ne pourrais terminer sans remercier ma famille et mes amis. Un énorme merci...

À Papa et Maman, pour tout votre soutien, vos encouragements et votre dévotion constante durant mes études ;

À ma sœur Mathilde, pour ton écoute empreinte d'empathie et pour m'avoir rendu la vie facile à je ne sais combien de reprises ;

À Papou, pour tout l'intérêt que tu portes à mon parcours scientifique et à Mamitou qui je le sais, aurait certainement éprouvé bien du plaisir à scruter mon texte ;

À Ulysse, pour ton amour et ta patience durant cette année bien remplie ;

À ma colocataire et amie Daphnée, pour toutes les fois où tu m'as remonté le moral avec nos discussions tardives et multiples fous rires ;

À Bonnie, ma deuxième sœur, pour ton appui inconditionnel ;

Et à Marco, Sam et Sandrine, toujours présents pour moi.

Merci à vous tous, et à bien d'autres encore.

CHAPITRE 1 – Introduction générale

1.1 Maintenance de l'architecture du système nerveux : généralités

Des efforts considérables ont été déployés pour élucider les mécanismes du développement du système nerveux. Des années de recherches et de développements technologiques ont permis d'impressionnantes avancées dans la compréhension de l'orchestration des étapes d'induction neurale jusqu'à l'élaboration de comportements complexes (Sanes et al., 2019). Un champ de neurobiologie en émergence qui nécessite tout autant d'attention concerne la capacité de l'organisme à maintenir à long terme l'assemblage initial du système nerveux pour en préserver l'intégrité structurelle et fonctionnelle (Bénard and Hobert, 2009). Les mécanismes assurant la maintenance de l'architecture du système nerveux demeurent encore mal compris.

1.1.1 Défis rencontrés : de la croissance au vieillissement

Tout au long de la vie, l'organisme fait face à une multitude de défis susceptibles de compromettre l'organisation du système nerveux établie avant la naissance. Dans cette section sera dressé un portrait des principaux éléments que le système nerveux doit affronter.

Le cerveau humain, composé de près de 100 milliards de neurones à la naissance, est un organe complexe marqué par une augmentation de trois à quatre fois son volume initial à l'âge adulte, principalement au niveau de la matière blanche (Toga et al., 2006; Tau and Peterson, 2010). La myélinisation des axones débute durant la vie fœtale, mais s'intensifie durant la vie post-natale, où 80 % de la taille finale du cerveau est atteinte durant les deux premières années de vie, une augmentation remarquable en une courte période (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Tau and Peterson, 2010). Le processus de myélinisation des axones se poursuit même plusieurs décennies après la naissance, particulièrement dans les aires associatives (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Également, l'incorporation de cellules au système perdure tout au long de la vie. Quelques exemples sont la prolifération homéostatique des microglies, soit les cellules immunitaires résidentes du système nerveux, l'angiogenèse et l'incorporation de nouveaux neurones durant le processus de neurogenèse adulte (Eriksson et al., 1998; Thion and Garel, 2017; Moreno-Jiménez et al., 2019; Prinz et al., 2019).

En outre, une période de maturation permet de spécialiser et consolider les circuits neuronaux immatures et passe notamment par une formation initiale en excès du nombre de neurones et synapses suivie de leur élimination sélective à grande échelle par des processus

d'apoptose et d'élagage synaptique (Hua and Smith, 2004; Sanes et al., 2019). Des périodes critiques de plasticité influencées par l'expérience sensorielle surviennent également pour façonner le traitement de l'information dans les aires visuelles, auditives et somatosensorielles (Reh et al., 2020). Un remodelage dendritique et des variations de densité d'épines dendritiques peuvent aussi être observés à l'âge adulte chez les rongeurs, indiquant que le système nerveux mature est capable de plasticité (Vyas et al., 2002; Tailby et al., 2005; Perez-Cruz et al., 2009). Malgré ces considérables modifications structurelles, le système nerveux reste apte à conserver l'organisation préétablie durant l'embryogenèse.

Les stress mécaniques constituent un défi supplémentaire auquel doit faire face le système nerveux. Par exemple, les mouvements corporels induisent des tensions sur les axones du système nerveux périphérique et la pression intraoculaire exerce un stress constant sur les neurones de la rétine (Topp and Boyd, 2006). Des mouvements internes tels que les battements cardiaques, le péristaltisme des intestins et la pulsation du liquide céphalorachidien constituent d'autres exemples de stress sur les neurones environnants.

Au fil du temps, des accidents peuvent survenir et affecter l'architecture neuronale. Quelques exemples sont les commotions cérébrales, les compressions de nerfs périphériques et les accidents vasculaires-cérébraux. Le système nerveux doit alors faire preuve de résilience pour contrer toutes ces atteintes ayant le potentiel d'altérer son organisation à long terme, l'inverse pouvant engendrer des déficits fonctionnels importants.

Enfin, le déclin progressif des différents systèmes de l'organisme survenant avec l'âge représente un processus physiologique influençant la maintenance du système nerveux qui à son tour, pourrait contribuer à l'accélération du vieillissement.

1.1.2 Importance de la recherche sur la maintenance neuronale

Une maintenance neuronale défaillante pourrait mener à l'apparition de conditions neuropathologiques : élucider les mécanismes de protection à long terme de l'architecture du système nerveux serait donc bénéfique pour notre population vieillissante. En effet, il est estimé que la population mondiale âgée de 60 ans et plus aura doublé d'ici 2050, et que les cas d'accidents vasculaires-cérébraux et de maladies neurodégénératives telles que les démences vont augmenter, l'âge constituant un facteur de risque important associé à leur développement (Béjot and Yaffe,

2019). Une retombée possible de la recherche fondamentale sur la maintenance à long terme du système nerveux chez les organismes modèles serait alors le développement et l'amélioration des diagnostics et traitements des maladies neurologiques liées à l'âge, ce qui aurait des répercussions positives pour notre société.

1.2 *C. elegans* comme modèle d'étude

Au laboratoire, les questions à l'étude sont investiguées avec le ver rond *Caenorhabditis elegans* (Figure 1), reconnu dans le monde scientifique pour sa polyvalence et son utilité dans les domaines de génétique et biologie cellulaire et moléculaire.

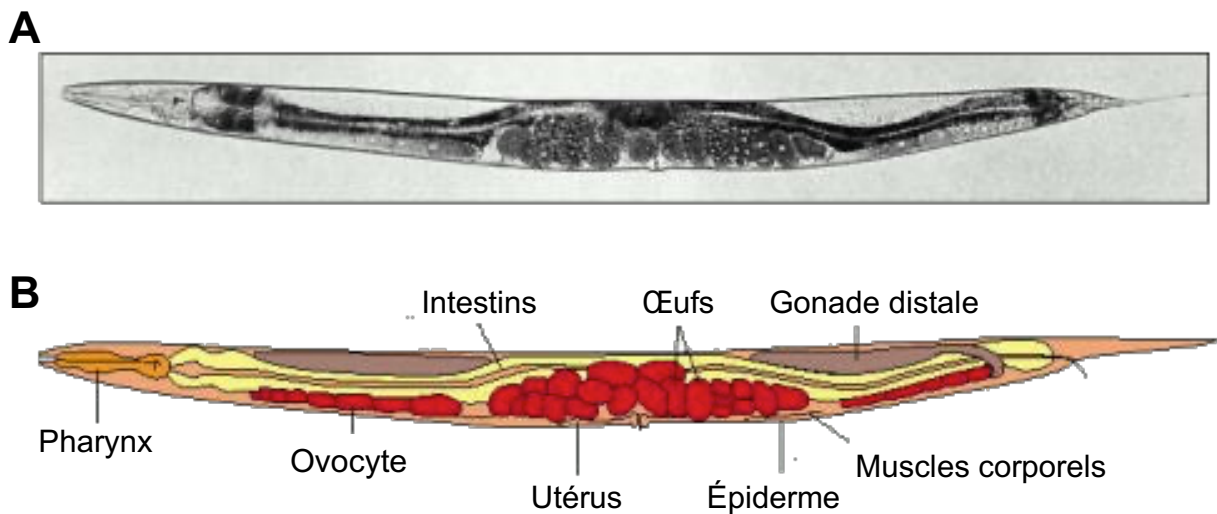


Figure 1. – Le *C. elegans* hermaphrodite. (A) Image de microscopie optique à fond clair d'un nématode adulte. (B) Représentation schématique de l'anatomie du nématode adulte. Image adaptée de Alberts et al. (2002).

1.2.1 Émergence du nématode comme organisme modèle

Au début du 20^e siècle, plusieurs chercheurs ont fait l'étude de nématodes, dont *C. elegans*, mais c'est réellement grâce aux travaux de Sydney Brenner en 1974 que l'utilisation de *C. elegans* comme organisme modèle a été propulsée (Brenner, 1974; Nigon and Félix, 2017). Depuis les travaux pionniers de Brenner, le nématode a permis de grandes avancées scientifiques parmi lesquelles se trouvent notamment la première caractérisation complète du lignage cellulaire d'un métazoaire en développement (1983), l'identification des gènes de l'apoptose (1983, Nobel 2002), l'emploi de la protéine fluorescente verte GFP comme marqueur d'expression génique (1994, Nobel 2008), le premier séquençage complet d'un génome métazoaire (1998) et la découverte de

l'ARN interférence (1998, Nobel 2006) (Hedgecock et al., 1983; Sulston et al., 1983; Chalfie et al., 1994; C. elegans Sequencing Consortium, 1998; Fire et al., 1998).

Le domaine des neurosciences est tout autant jalonné d'exploits comme la complétion du connectome entier d'un système nerveux (1986), la découverte de gènes de guidance axonale (1987), l'identification de gènes synaptiques conservés (1993) et la première utilisation d'une channelrhodopsine pour induire un comportement (2005) (White et al., 1986; Hedgecock et al., 1987; Gengyo-Ando et al., 1993; Richmond et al., 1999; Varshney et al., 2011; Cook et al., 2019; Witvliet et al., 2021). L'impact scientifique de la recherche faite avec le nématode est clair et son utilisation continuera certainement de faire des percées majeures.

1.2.2 Avantages

C. elegans bénéficie de plusieurs qualités faisant de lui un puissant modèle génétique. D'abord, sa petite taille, soit 1 mm à l'âge adulte, permet de le cultiver très facilement et en grande quantité dans des boîtes de Pétri contenant des bactéries, réduisant ainsi les dépenses associées à leur entretien. De plus, son cycle de vie très court permet au nématode d'atteindre l'âge adulte en seulement trois jours (Figure 2), la durée de vie totale du ver étant d'environ trois semaines (Cassada and Russell, 1975; Byerly et al., 1976).

L'espèce se présente sous forme d'hermaphrodites capables d'autofécondation, toutefois, une faible proportion de mâles (~0,1 %) existe dans la nature suite à une non-disjonction méiotique du chromosome X (Hodgkin et al., 1979). L'utilisation des mâles facilite grandement l'exécution de croisements génétiques avec l'hermaphrodite pour générer de nouvelles souches. L'abondante progéniture d'environ 300 animaux produite par l'hermaphrodite autoféconde permet ensuite de maintenir les souches sans que des croisements additionnels ne soient requis. Des expériences peuvent ainsi être menées en peu de temps avec l'obtention d'une taille d'échantillon importante. À noter également que ce nématode très résistant peut être congelé à -80 °C, ce qui permet d'entreposer une variété de souches mutantes à long terme avec très peu d'entretien et en minimisant les effets de dérive génétique.

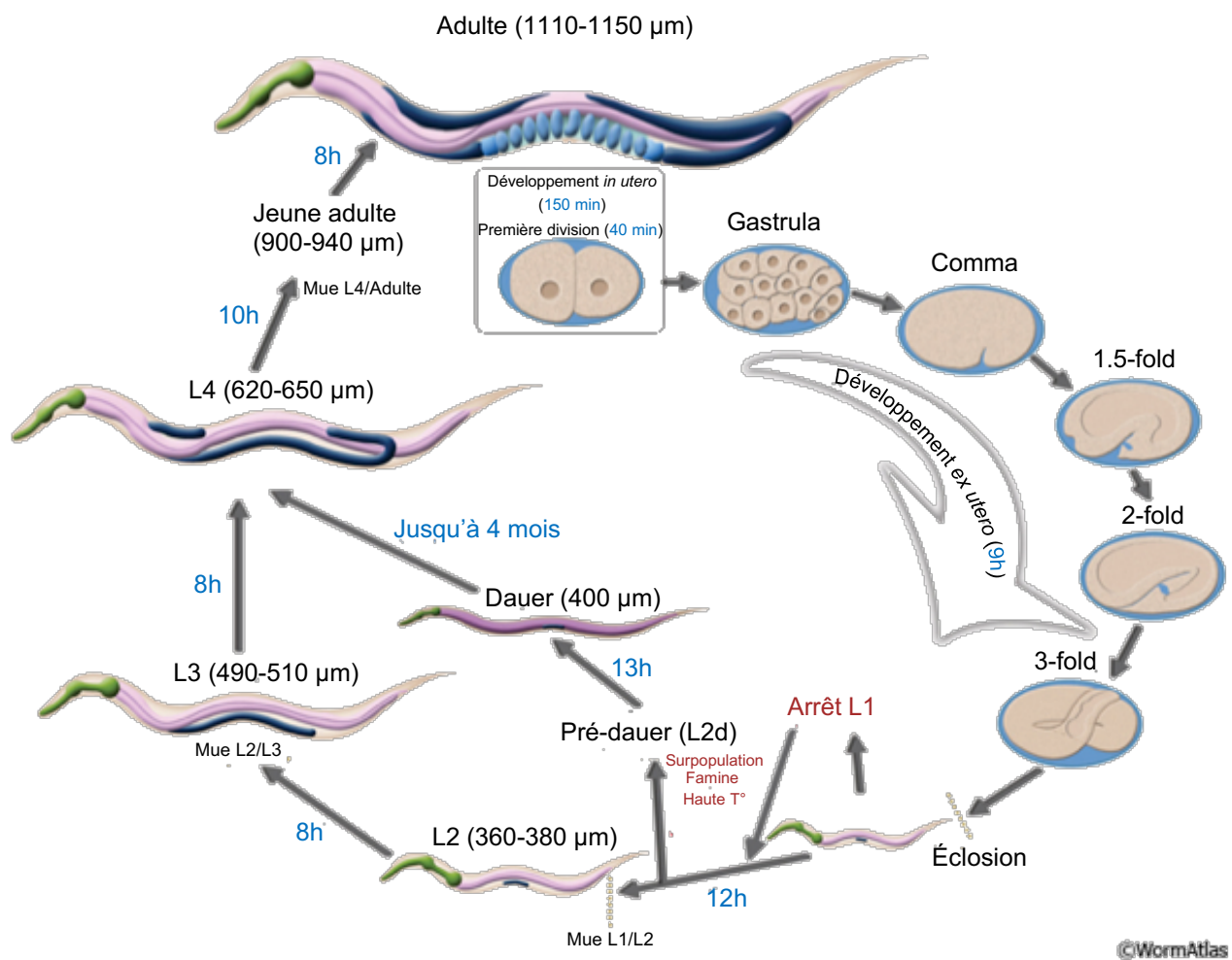


Figure 2. – Schématisation du cycle de vie du *C. elegans* à 22°C. Après son éclosion, le nématode poursuit sa croissance en quatre stades larvaires (L1 à L4) avant d'atteindre maturité. Il peut opter pour un stade alternatif (*dauer*) pour résister à des stress environnementaux importants avant de poursuivre son développement lorsque les conditions redeviennent favorables. Image adaptée de WormAtlas.

Par ailleurs, un avantage considérable que procure le nématode est sa transparence. Elle permet la visualisation des structures cellulaires et subcellulaires avec des techniques de microscopie, mais également l'emploi de méthodes d'optogénétique *in vivo*. Des approches de biologie cellulaire et moléculaire sont aussi aisément implantables dans cet organisme, notamment la transgénèse qui favorise l'étude de voies moléculaires et des interactions génétiques. Cet aspect est d'autant plus facilité par le fait que le génome est entièrement séquencé, rendant l'identification

de nouveaux gènes accessible au moyen de cribles génétiques (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

Enfin, *C. elegans* possède un nombre invariable de 959 cellules somatiques et est doté des principaux tissus et systèmes présents chez l'humain tels que l'épiderme, les muscles, l'appareil reproducteur, le système digestif et le système nerveux (Sulston and Horvitz, 1977; Kimble and Hirsh, 1979; Sulston et al., 1983). Il est alors possible d'effectuer des parallèles chez l'humain par la compréhension de leur fonctionnement. D'ailleurs, 60 à 80 % des gènes chez l'humain ont un orthologue chez *C. elegans* (Kaletta and Hengartner, 2006; Shaye and Greenwald, 2011). De surcroît, 40 % de gènes à l'origine de pathologies humaines possèdent également un orthologue chez le ver, favorisant la découverte de mécanismes pathologiques conservés (Culetto and Sattelle, 2000). À cela s'ajoute un point très positif de la communauté travaillant sur *C. elegans* : le partage de connaissances et de ressources avec une vision *Open Science* stimulant la recherche et accélérant les découvertes. Quelques exemples sont la documentation offerte sur *WormAtlas*, *Wormbook* et *Wormbase*, les bases de données d'expression génique comme le projet ceNGEN et *VisCello*, la génération de mutants par le *Million Mutation Project* ainsi que l'entreposage de milliers de souches par le *Caenorhabditis Genetics Center* (Altun et al., 2002-2021; Thompson et al., 2013; Hammarlund et al., 2018; Packer et al., 2019).

Étant donné les maints avantages que procure son utilisation, *C. elegans* est le modèle expérimental préconisé au laboratoire pour traiter de questions neurobiologiques.

1.2.3 Le système nerveux du *C. elegans*

Le système nerveux de l'hermaphrodite (Figure 3) comporte invariablement 302 neurones (Sulston and Horvitz, 1977; White et al., 1986). 282 d'entre eux composent le système nerveux somatique et 20 autres, le système nerveux du pharynx (Albertson et al., 1976; White et al., 1986). La morphologie neuronale est simple, souvent unipolaire ou bipolaire malgré quelques exceptions d'arborisations élaborées (FLP et PDV), et l'organisation des neurones se fait en ganglions et fascicules (White et al., 1986). Les plus importants se trouvent au niveau de la tête où 180 neurones projettent leur axone pour former l'anneau nerveux, soit le neuropile principal souvent surnommé le « cerveau » du ver (White et al., 1986). Deux autres ganglions se retrouvent au niveau de la corde ventrale et de la queue, et des commissures relient les régions dorsales et ventrales.

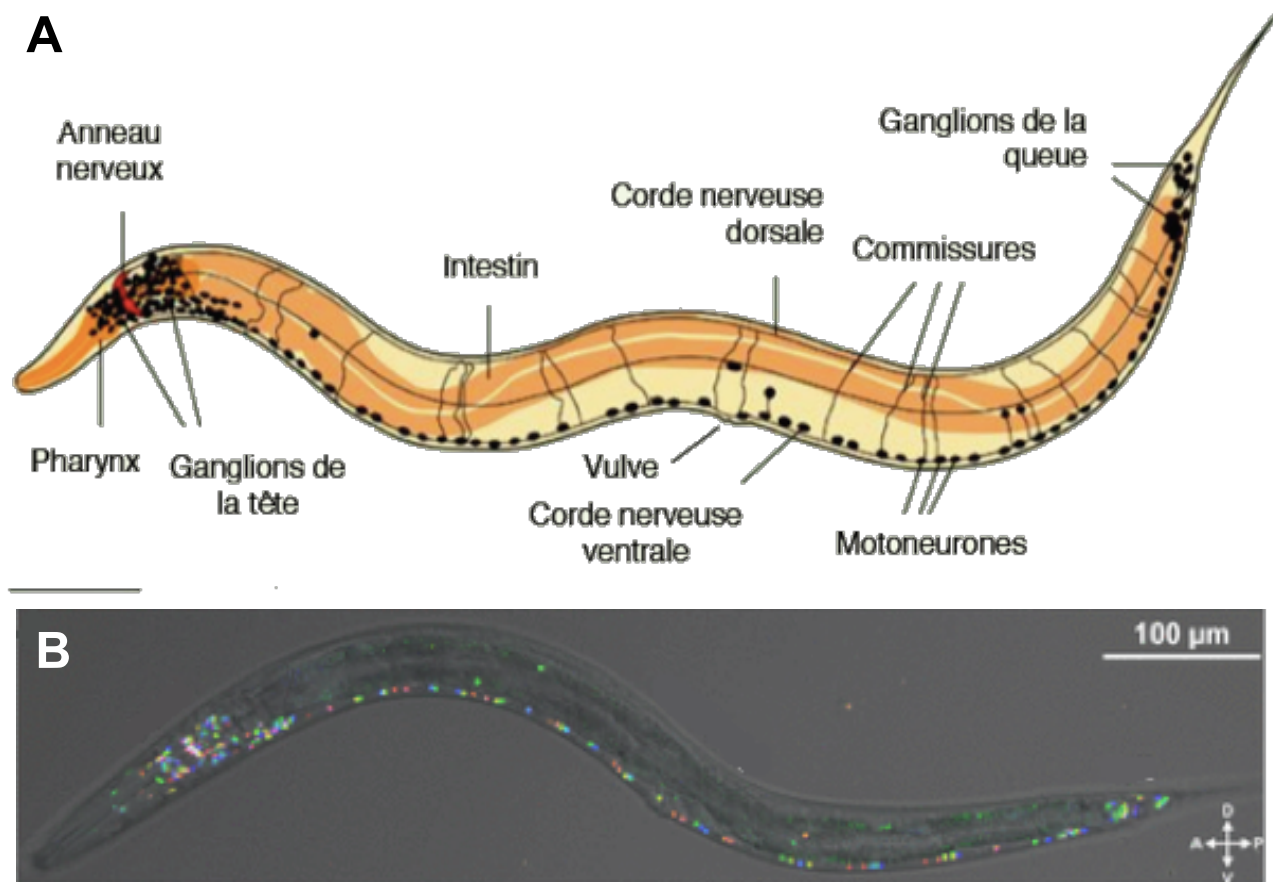


Figure 3. – L'organisation du système nerveux du *C. elegans*. (A) Représentation simplifiée du système nerveux. (B) Image de microscopie à fluorescence d'un nématode adulte permettant l'identification des 302 neurones à l'aide du rapporteur fluorescent NeuroPAL se localisant au noyau. Échelles = 100 μm . Image A adaptée de Gally et Bessereau (2003) et B de Yemini et al., (2021).

La croissance axonale et la connectivité synaptique sont en grande partie achevées chez la larve naissante, qui possède déjà 222 neurones ayant été formés durant la phase proliférative de l'embryogenèse (Sulston and Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983; White et al., 1986). 25 % des neurones restants sont générés durant les phases tardives des premier et second stades larvaires pour former certains motoneurones de la corde ventrale, la paire de motoneurones RMF de la tête ainsi que des neurones sensoriels au milieu du corps. La position relative des neurones étant très conservée, elle a permis à White et al. de classifier les neurones en plus de 118 catégories différentes selon les axes antéro-postérieur, dorso-ventral et latéral droite/gauche (White et al., 1986).

Par ailleurs, l'organisation de la position neuronale semble d'importance pour l'élaboration de partenaires synaptiques puisque 45 % des contacts se font entre deux neurones adjacents (White et al., 1983). La connectivité neuronale du système nerveux se fait au moyen de ~7000 synapses, soit 6393 synapses chimiques, 890 jonctions gap, et 1410 jonctions neuromusculaires (White et al., 1986; Varshney et al., 2011). La transmission aux synapses chimiques se fait « en passant », et les principaux neurotransmetteurs retrouvés chez les mammifères (GABA, glutamate, acétylcholine, dopamine, sérotonine et autres monoamines et neuropeptides) sont conservés chez le nématode (McIntire et al., 1993; Chase and Koelle, 2007; Serrano-Saiz et al., 2013; Pereira et al., 2015). Jusqu'à récemment, aucun potentiel d'action n'avait été détecté, mais une étude a indiqué que les neurones olfactifs AWA sont capables d'en générer, ouvrant les portes à un nouveau champ d'étude (Liu et al., 2018).

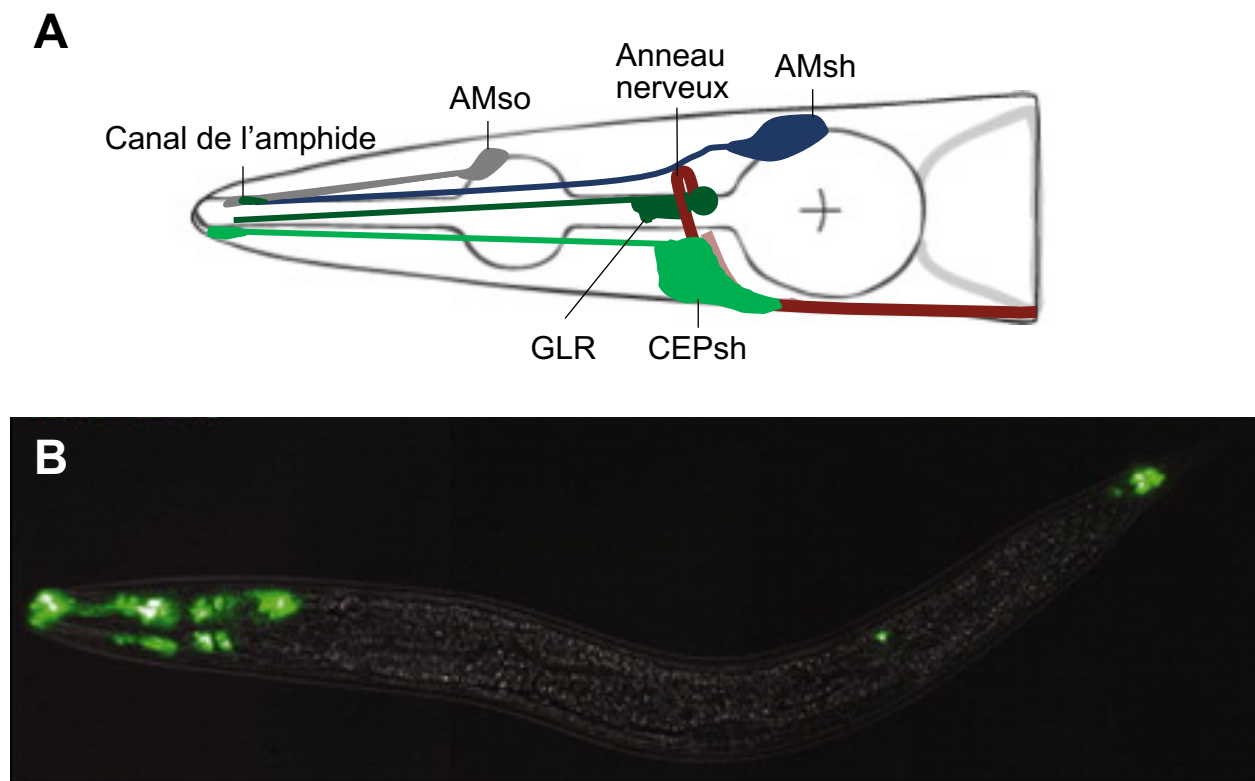


Figure 4. – Les cellules gliales du *C. elegans*. (A) Schématisation des types de cellules gliales au niveau de la tête du nématode. L'AMso et l'AMsh forment un canal autour des neurones sensoriels de l'amphide. Les GLR sont situées sur la face interne du neuropile tandis que les CEPsh le recouvrent. (B) Image de microscopie à fluorescence permettant de visualiser les 50 cellules gliales dérivant de l'ectoderme au moyen du rapporteur fluorescent *Pmir-228::gfp*. Image B adaptée de Fung et al. (2020).

Les cellules gliales, initialement considérées comme des « cellules de soutien » dans les travaux de reconstruction du système nerveux, représentent le second type cellulaire constituant le système nerveux du nématode. Au total, 50 cellules gliales dérivent de l'ectoderme, et 6 cellules *glial-like* dérivent du mésoderme (Figure 4). Ces cellules sont associées aux organes sensoriels de la tête et de la queue et à proximité du neuropile qui sont à l'origine de la génération de comportements complexes. Leur étude ayant été délaissée au profit de celle des neurones, Shai Shaham a été l'instigateur de l'examen du fonctionnement et des rôles des cellules gliales au sein du système nerveux chez *C. elegans* au cours des dernières années.

La vision datant du 20^e siècle que les cellules gliales soutenaient passivement les neurones n'est plus d'actualité : les cellules gliales contribuent activement à presque tous les niveaux du développement et fonctionnement du système nerveux. Des déficits liés aux cellules gliales contribuent à de nombreuses neuropathologies, dont les maladies neurodégénératives comme la sclérose latérale amyotrophique, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Zuchero and Barres, 2015; Stevenson et al., 2020). Entre autres, elles participent à la formation des circuits neuronaux en prenant part aux processus de neurogénèse, de guidance et spécification des neurites, de synaptogenèse, d'élagage de synapses et de régulation de l'environnement neuronal en plus de constituer un soutien neurotrophique et métabolique aux neurones (Corty and Freeman, 2013; Zuchero and Barres, 2015; Allen and Lyons, 2018). Les quinze dernières années de recherches ont permis d'identifier que ces rôles sont conservés chez le nématode et certaines fonctions normalement attribuées aux cellules gliales sont également occupées par l'épiderme (Yang and Chien, 2019; Fan et al., 2020; Rapti, 2020). Toutefois, des différences existent entre les cellules gliales des vertébrés et du nématode. D'abord, les axones du ver ne sont pas myélinisés par des cellules gliales, fonction occupée par les oligodendrocytes et cellules de Schwann chez l'humain, probablement dû à la courte longueur du ver (White et al., 1986; Zuchero and Barres, 2015). De plus, le ratio glies-neurones est bien moins important chez le ver et elles sont concentrées à des régions bien précises du système nerveux (Singhvi and Shaham, 2019). Le nématode ayant un nombre déterminé de cellules, elles ne montrent pas de capacité de prolifération comme c'est le cas chez les mammifères (Zuchero and Barres, 2015). Enfin, ces cellules ne semblent pas requises pour la survie neuronale, ce qui constitue un avantage pour élucider les mécanismes régulateurs indépendamment des fonctions trophiques (Singhvi and Shaham, 2019).

En somme, le système nerveux du nématode est très simple, mais comporte malgré tout un certain degré de complexité. Cela fait de lui un modèle de choix pour traiter les questions spécifiques de maintenance de l'architecture du système nerveux *in vivo*.

1.3 Maintenance du système nerveux chez *C. elegans*

C. elegans est d'autant plus idéal pour étudier la maintenance neuronale, car il fait face à la plupart des mêmes défis de maintenance que l'humain (Figure 5) : 1) il connaît une phase de croissance importante, atteignant un volume près de cent fois plus grands qu'à l'éclosion et au cours de laquelle les neurones maintiennent un nombre de contacts synaptiques stables, 2) le système nerveux subit des modifications post-développementales, notamment lors de l'ajout de neurones et des périodes de plasticités (p.ex., remaniement de certains contacts synaptiques et passage au stade *dauer* lors de stress environnementaux) et 3) il fait face à des stress mécaniques engendrés par la locomotion, le pompage du pharynx lors de l'alimentation, la défécation et la ponte d'œufs (White et al., 1986; Hu, 2007; Bénard and Hobert, 2009; Bozorgmehr et al., 2013; Witvliet et al., 2021).

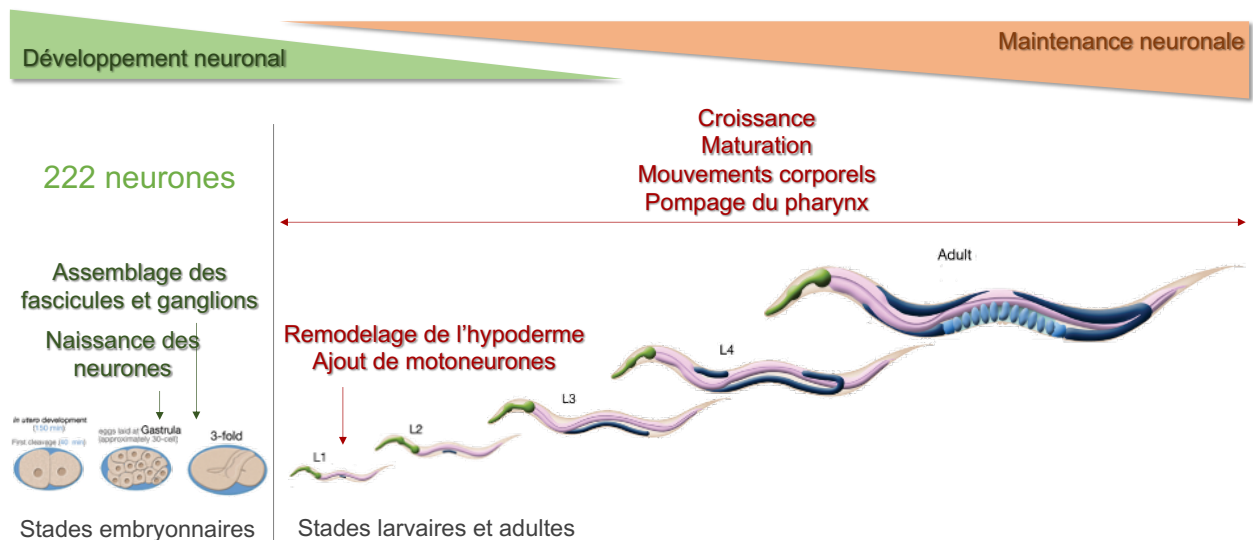


Figure 5. – Le nématode comme modèle d'étude de la maintenance neuronale. La majorité de l'assemblage du système nerveux se fait durant l'embryogenèse et doit persister malgré plusieurs défis tout au long de la vie. Image créée par Virginie Desse, laboratoire Bénard.

La majorité des structures étant développées au stade embryonnaire, des mécanismes intrinsèques et extrinsèques doivent alors exister pour assurer l'intégrité de la formation initiale du système nerveux tout au long de la vie, tant au niveau cellulaire qu'au niveau des ensembles cellulaires. Un bref aperçu des différents types de facteurs de maintenance sera présenté dans la section suivante.

1.3.1 Facteurs de maintenance des propriétés neuronales

1.3.1.1 Morphologie

La morphologie du neurone est maintenue à long terme par une variété de mécanismes chez le nématode. Par exemple, des protéines influençant la stabilité du cytosquelette et/ou le transport vésiculaire, telles que la α -tubuline constituant les microtubules ou la β -spectrine, permettent la préservation structurelle des neurites contre le stress mécanique (Hsu et al., 2014; Coakley et al., 2020). De plus, DIP-2 (*disco-interacting protein 2*), une protéine peu connue dont l'homologue chez l'humain est un récepteur candidat pour la Follistatine-like 1, agit pour prévenir la formation de neurites ectopiques dans des neurones à des stades larvaires tardifs et à l'âge adulte et favorise la régénération axonale après une lésion (Noblett et al., 2019). Le maintien de la polarité neuronale est également influencé par des facteurs très connus pour leurs rôles développementaux, soit UNC-6/Nétrine et son récepteur UNC-5, qui empêchent la présence de vésicules présynaptiques aux dendrites (Poon et al., 2008).

À l'échelle neuronale, les synapses sont également maintenues dans le temps, un premier pas vers la maintenance des assemblages de neurones dont il sera question plus loin. La densité synaptique aux motoneurones cholinergiques peut par exemple persister grâce à ZIG-10, une protéine transmembranaire d'adhésion cellulaire de la famille conservée des immunoglobulines (Cherra and Jin, 2016). ZYX-1, une protéine homologue à la zyxin recrutée aux adhésions focales, permet quant à elle de stabiliser les synapses des neurones mécanosensoriels PLM contre les stress mécaniques (Luo et al., 2014). Une interaction entre des facteurs provenant de l'épiderme (CIMA-1, EGL-15) et des muscles (MIG-17) permettent aussi de maintenir la position synaptique durant la croissance larvaire via la régulation de la matrice extracellulaire et la morphologie gliale (Shao et al., 2013; Fan et al., 2020).

De tels mécanismes influençant entre autres la stabilité du cytosquelette, l'adhésion cellulaire et la matrice extracellulaire sont conservés chez les vertébrés pour assurer la maintenance des neurites et des synapses (Szu-Yu Ho and Rasband, 2011; Park and Goda, 2016; Nguyen et al., 2020).

1.3.1.2 Fonction

La préservation de l'identité d'un neurone est à la base de sa fonction. Une étude chez le nématode a révélé qu'il existait une poignée de facteurs de transcription nommés « sélecteurs terminaux » contrôlant les sous-types neuronaux par leur action continue sur des « gènes effecteurs » (Hobert and Kratsios, 2019). Un exemple d'un sélecteur terminal est CHE-1, qui contrôle et maintient le destin cellulaire des neurones chimiosensoriels asymétriques ASE (Etchberger et al., 2009; Leyva-Diaz and Hobert, 2019). Un autre de ces facteurs est même conservé chez la souris : UNC-86/Brn3a maintient l'identité de divers types neuronaux chez *C. elegans* ainsi que celle de neurones de l'habenula médiale chez la souris (Serrano-Saiz et al., 2018).

Par ailleurs, les cellules gliales représentent un facteur externe pour maintenir la fonction neuronale. La cellule gliale associée à l'organe sensoriel de l'amphide, la AMsh (*Amphid Sheath*), assure la thermosensation des neurones AFD en maintenant la forme de sa terminaison sensorielle par la phagocytose dynamique de fragments neuronaux et par le contrôle du milieu ionique (Singhvi et al., 2016; Raiders et al., 2021). D'autres cellules gliales, les CEPsh (*Cephalic Sheath*), contrôlent aussi les niveaux de glutamate extracellulaire dans l'environnement neuronal pour éviter l'hyperexcitabilité neuronale, fonction conservée chez la souris, menant à l'augmentation du nombre d'inversions de la locomotion vers l'arrière (Aida et al., 2015; Katz et al., 2019).

Enfin, des mécanismes régulant l'homéostasie intrinsèque des neurones comme le maintien de la protéostasie au moyen de mécanismes évitant un mauvais repliement protéique (p.ex. protéines chaperonnes et protéasome) ou encore la relâche de vésicules nommées *exophers* contenant des organelles endommagées et agrégats protéiques, permettent d'assurer le maintien à long terme de la fonction neuronale (Melentijevic et al., 2017; Hipp et al., 2019).

1.3.2 Facteurs de maintenance d'ensembles neuronaux

Cette catégorie de mécanismes de maintenance est encore à ce jour peu étudiée. Seuls quelques groupes ont su démontrer l'action post-développementale de molécules spécifiques sur la maintenance à grande échelle de l'architecture neuronale chez *C. elegans* (Figure 6) (Aurelio et al., 2002; Bülow et al., 2004; Sasakura et al., 2005; Bénard et al., 2006; Pocock et al., 2008; Bénard and Hobert, 2009; Bénard et al., 2009; Desse et al., 2021). Pour la suite de ce mémoire, les termes « maintenance neuronale » et « maintenance du système nerveux » seront interchangeables pour décrire l'action de facteurs sur la maintenance de l'assemblage structural de groupes de neurones.

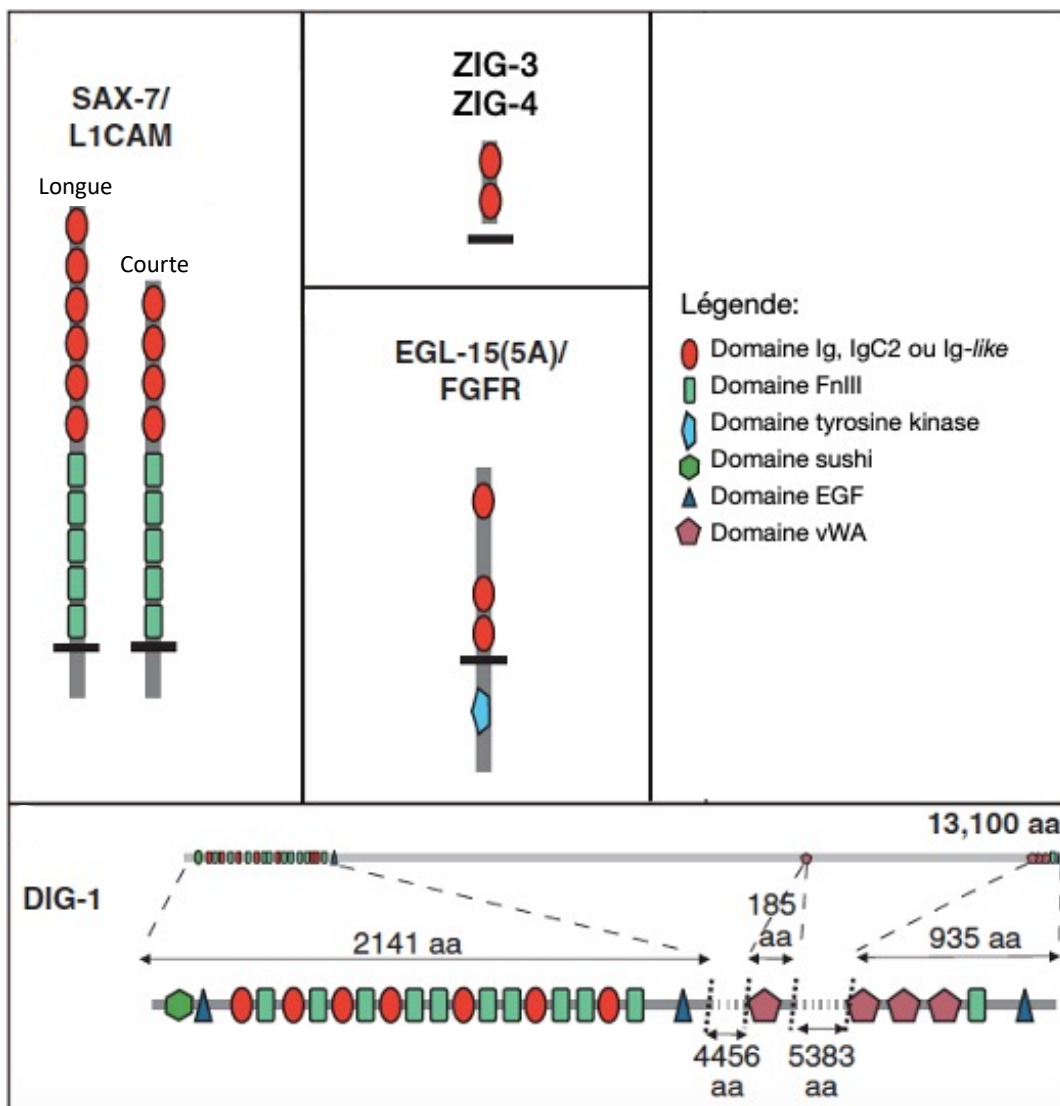


Figure 6. – Facteurs de maintenance neuronale identifiés chez *C. elegans*. Diverses molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines assurent la maintenance de l'organisation des ganglions et des fascicules chez le nématode. Image adaptée de Bénard et Hobert (2009).

1.3.2.1 Maintenance des fascicules

Certains facteurs agissent spécifiquement pour maintenir la position des axones au sein d'un fascicule sans affecter l'organisation neuronale des ganglions (Aurelio et al., 2002; Bülow et al., 2004; Bénard et al., 2009). De petites protéines contenant deux domaines immunoglobulines, ZIG-3 et ZIG-4, sont sécrétées par l'interneurone PVT pour préserver la position axonale des neurones PVQ et PVP dans la corde nerveuse ventrale (Aurelio et al., 2002; Bénard et al., 2009). Similairement, l'isoforme EGL-15(5A) appartenant aussi à la superfamille des immunoglobulines, un orthologue du récepteur des facteurs de croissance des fibroblastes des vertébrés (FGFR), est aussi impliquée dans la maintenance axonale de PVQ et PVP et agit cette fois à partir de l'épiderme pour médier cet effet (Bülow et al., 2004).

1.3.2.2 Maintenance des ganglions et fascicules

D'autres molécules permettent à la fois le maintien post-développemental de fascicules et de ganglions (Figure 7). C'est par exemple le cas de DIG-1, une imposante protéine extracellulaire de 13 100 acides aminés, qui permet la maintenance des axones de la corde nerveuse ventrale, mais également la préservation de la position de neurones chimiosensoriels (ASH et ASI) relativement à l'anneau nerveux (Bénard et al., 2006). Cette protéine de la superfamille des immunoglobulines est sécrétée par les muscles et contient une variété de domaines d'interaction dont le rôle pourrait être de coordonner l'adhésion des neurones avec leur environnement (Bénard and Hobert, 2009).

Enfin, SAX-7 est une protéine transmembranaire orthologue à la famille L1CAM des vertébrés (L1, CHL1, Neurofascine et NrCAM) dont l'action post-développementale assure le maintien des ganglions de la tête et des fascicules des cordes nerveuses ventrale et latérale chez *C. elegans* (Sasakura et al., 2005; Wang et al., 2005; Pocock et al., 2008; Chen and Zhou, 2010; Ramirez-Suarez et al., 2019; Desse et al., 2021). Cette protéine fait également partie de la superfamille des immunoglobulines et se présente sous formes courte (SAX-7C) et longue (SAX-7L), mais seule l'isoforme courte fonctionnent pour maintenir l'architecture du système nerveux, dont des produits clivés sont les plus abondants (Desse et al., 2021).

Le laboratoire poursuit activement des recherches sur SAX-7/L1CAM, vu la place importante qu'occupe cette molécule au sein du système nerveux. En effet, outre ses rôles développementaux bien connus conservés du nématode à l'humain et son implication dans un ensemble de maladies neurodéveloppementales qualifié de « syndrome L1 », la molécule

d'adhésion SAX-7/L1CAM semble aussi posséder des rôles post-développementaux chez la souris adulte : une déplétion conditionnelle du gène L1 mène à une augmentation de la transmission synaptique excitatrice et déficits comportementaux (ref Law et al 2003), une perte de CHL1 à l'âge adulte engendre des troubles de mémoire de travail et une inactivation de la Neurofascine dans les cellules de Purkinje du cervelet altère le segment initial de l'axone, supprime la dépolarisation tonique et entraîne des déficits d'apprentissage moteur (Weller and Gartner, 2001; Kolata et al., 2008; Zonta et al., 2011; Hortsch et al., 2014). De plus, une déplétion conditionnelle de NrCAM chez la souris adolescente diminue la densité des épines dendritiques de neurones pyramidaux des cortex frontal médian et visuel primaire (Mohan et al., 2018). Cela démontre la pertinence de poursuivre l'étude des rôles post-développementaux de SAX-7 chez *C. elegans*.

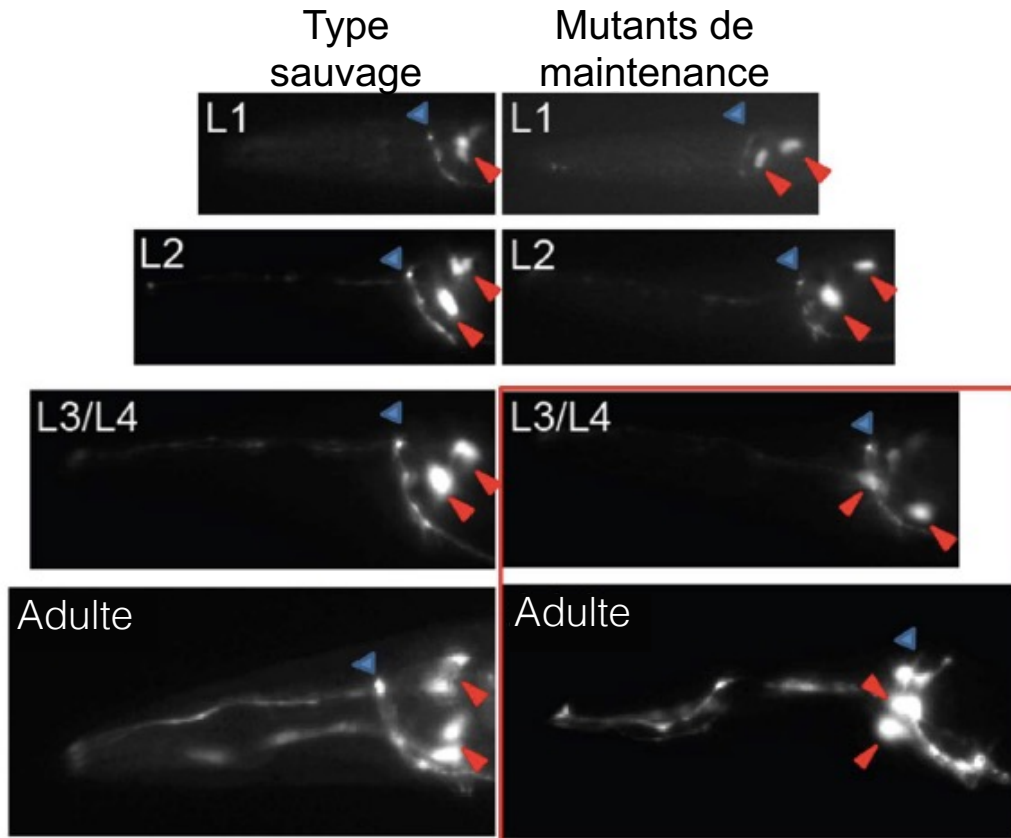


Figure 7. – Exemple de défauts de maintenance neuronale. Jusqu'au 2^e stade larvaire, les corps cellulaires des neurones visualisés avec le rapporteur *oyIs14 (P_{sra-6}::gfp)*, indiqués par les flèches rouges, sont correctement positionnés postérieurement à l'anneau nerveux, indiqué par les flèches bleues, chez les mutants de maintenance neuronale et chez le type sauvage. À partir du 3^e stade larvaire, une désorganisation progressive des ganglions neuronaux (encadré rouge) survient chez les mutants de maintenance neuronale contrairement au type sauvage. Image adaptée de Bénard et al. (2012).

1.5 Axes de l'étude

Dans le but d'étendre les recherches sur la maintenance de l'architecture du système nerveux, le laboratoire a précédemment effectué un crible génétique d'identification de suppresseurs des défauts de maintenance des ganglions neuronaux des mutants *sax-7/L1CAM*. Parmi les candidats identifiés se trouve MIG-6/Papiline, une glycoprotéine conservée de la matrice extracellulaire (Nadour et al., en préparation). Cette opposition entre facteurs d'adhésion et matrice extracellulaire est très révélatrice, car elle semble notamment être impliquée dans la régulation de la plasticité des structures synaptiques dans divers contextes (Heckman and Doe, 2021). La maintenance neuronale à grande échelle emploie-t-elle un mécanisme similaire ?

Par ailleurs, bien que l'étude des cellules gliales ait longtemps été négligée, les recherches des dernières décennies indiquent que ce type cellulaire joue des rôles clés dans le développement et fonctionnement du système nerveux (Zuchero and Barres, 2015). C'est également le cas chez le nématode, où de plus en plus de groupes mettent de l'avant les contributions neuro-développementales et neuromodulatrices des cellules gliales (Singhvi and Shaham, 2019). Une question importante et novatrice est de savoir si ces cellules participent également au maintien de l'architecture du système nerveux.

Ces travaux de maîtrise ont donc été menés selon deux axes d'étude (Figure 8) visant à caractériser l'importance de facteurs extrinsèques dans la maintenance à long terme du système nerveux, chacun d'entre eux sera traité séparément dans les prochains chapitres :

- 1) Déterminer le rôle de la matrice extracellulaire dans la maintenance neuronale
- 2) Explorer les cellules gliales dans un contexte de maintenance neuronale.

Maintenance de l'architecture du système nerveux

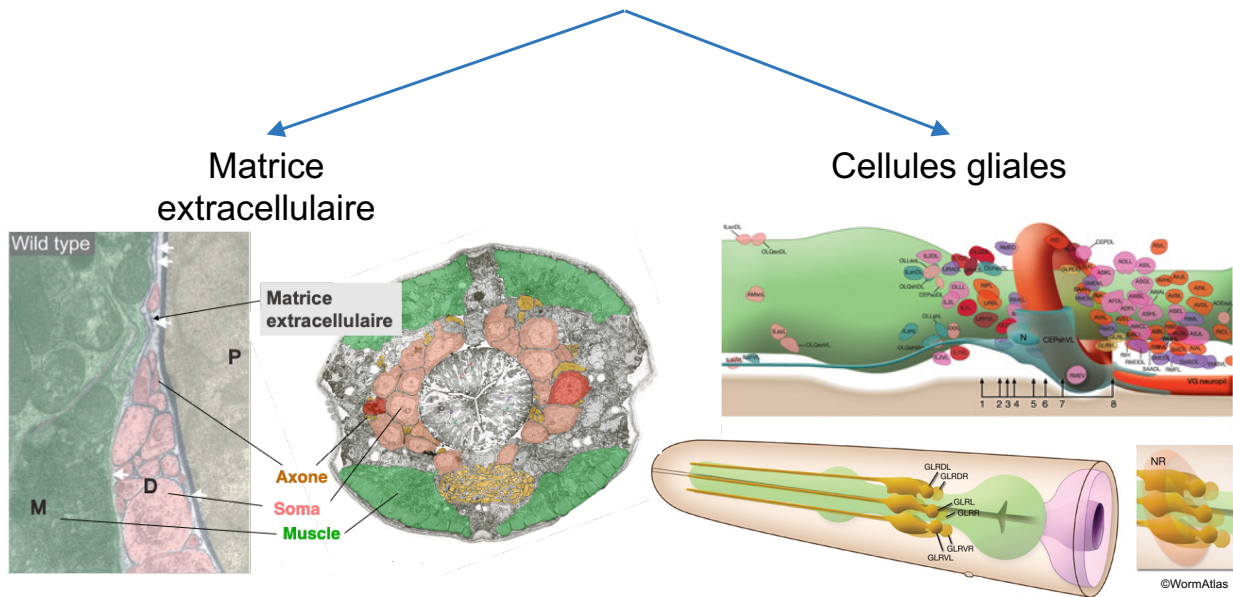


Figure 8. – Présentation des axes de l'étude. Deux facteurs extrinsèques seront étudiés en contexte de maintenance neuronale : la matrice extracellulaire et les cellules gliales. (Gauche) Coupes de microscopie électronique au niveau de la tête d'un nématode adulte. La matrice extracellulaire forme des couches denses entourant les structures neuronales pour les séparer des muscles de la paroi du corps et du pharynx. (Droite) Les cellules gliales sont également en contact intime avec le neuropile (faces interne et externe) et des ganglions neuronaux de la tête du nématode. Images adaptées de Bénard et al. (2006) et WormAtlas.

CHAPITRE 2 – Rôle de la matrice extracellulaire dans la maintenance neuronale

2.1 Introduction

2.1.1 Crible génétique d'identification de suppresseurs de défauts de maintenance neuronaux *sax-7*/L1CAM

Les mutants de maintenance *sax-7*, en plus de posséder des défauts de maintenance de position d'axones au sein de la corde nerveuse ventrale, présentent une désorganisation des ganglions de la tête qui 1) est spécifique à certains neurones, 2) apparaît progressivement à partir du 4^e stade larvaire, après un développement embryonnaire normal de ces structures neuronales, et 3) dépend du stress mécanique induit par la locomotion, une paralysie des vers supprimant l'apparition de défauts de maintenance (Bénard et al., 2012; Desse et al., 2021).

Précédemment effectué par des membres du laboratoire, un dépistage de suppresseurs de la désorganisation progressive des mutants de maintenance neuronale *sax-7* a mené à l'identification d'une mutation du gène *mig-6* (Figure 9A-B) (Nadour et al., en préparation). L'allèle *qv18* identifié résulte d'une substitution d'une glycine pour un acide glutamique au 664^e acide aminé induisant une perte de fonction. Cette mutation a été réintroduite par CRISPR-Cas9, correspondant maintenant à l'allèle *qv33*, ce qui confirme la spécificité du phénotype au gène *mig-6*. Ces résultats ont été complétés par des expériences de sauvetage, d'ARN interférence et d'analyses d'interaction d'autres mutations du gène *mig-6* avec *sax-7*, ce qui a permis d'établir sans équivoque l'identité du gène suppresseur des défauts de maintenance neuronale des mutants *sax-7* comme *mig-6*/Papiline (Nadour et al., en préparation). Un transgène codant pour l'isoforme courte de *mig-6* (*mig-6C*) rétablit la fonction de *mig-6* dans le contexte de maintenance neuronale.

2.1.2 MIG-6/Papiline : une protéine conservée de la matrice extracellulaire

MIG-6, homologue de la papiline, est une protéine conservée de la matrice extracellulaire, plus précisément des membranes basales, qui se présente en deux isoformes : une longue (MIG-6L) et une courte (MIG-6C) (Figure 9C). Les fonctions de MIG-6/Papiline sont très peu connues, mais des études ont révélé qu'elle est impliquée dans des processus développementaux, soit la formation de la gonade, du pharynx et de la morphologie dendritique de PVD chez le nématode ainsi que le développement des muscles chez la drosophile (Kramerova et al., 2000; Kawano et al., 2009; Jafari et al., 2010; Ramirez-Suarez et al., 2019). Chez *C. elegans*, cette glycoprotéine est

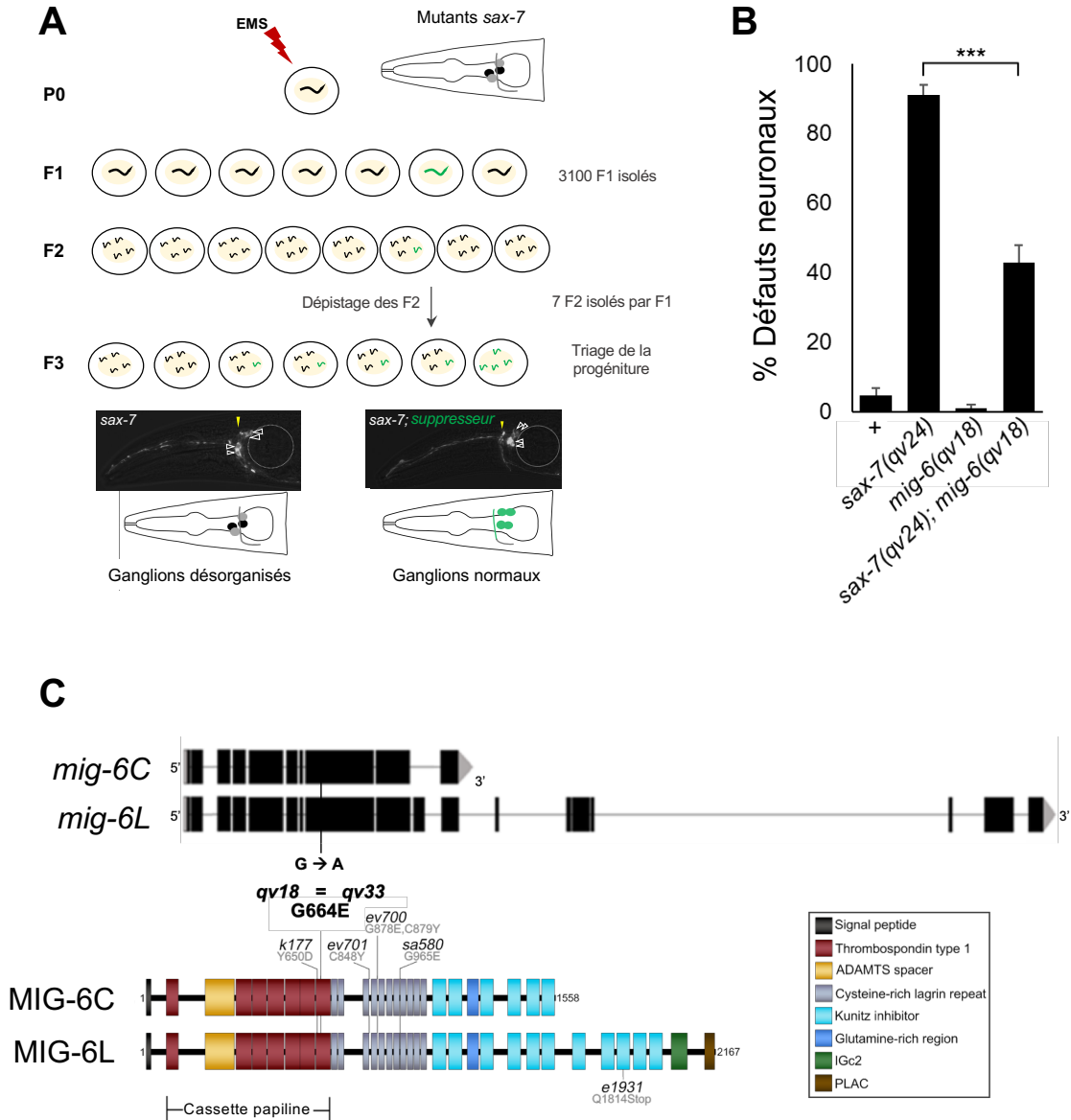


Figure 9. – Identification d'un suppresseur des défauts de maintenance neuronale *sax-7* par le laboratoire Bénard. (A) Schéma explicatif du crible génétique effectué. La mutagenèse des mutants de maintenance *sax-7* a été induite avec du méthanesulfonate d'éthyle (EMS) pour identifier des animaux mutants présentant une organisation correcte des neurones ASH/ASI (vert) des ganglions de la tête. (B) Quantification des défauts d'organisation neuronale entre les corps cellulaires des neurones ASH/ASI relativement au neuropile (Proportion \pm erreur standard de proportion, tests Z avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). Un séquençage de génome entier a permis d'identifier *mig-6(qv18)* comme suppresseur des défauts de maintenance neuronale *sax-7*. (C) Représentations schématiques du locus (haut) de *mig-6* présentant les isoformes courte et longue ainsi que leur structure protéique (bas). La position des allèles mutants est indiquée. L'allèle *qv33* engendrant une perte de fonction de *mig-6* est une réintroduction par CRISPR-cas9 de l'allèle mutant *qv18* à l'origine de la suppression des défauts de maintenance *sax-7*. À noter que l'allèle *e1931* est spécifique à MIG-6L. La différence significative est indiquée par des astérisques (***) $p \leq 0,001$). Images adaptées de Nadour et al. (en préparation).

exprimée par les muscles de la paroi du corps, la cellule de pointe distale de la gonade, la cellule mésodermique de la tête (hmc), les neurones CAN, les cœlomocytes et les GLR (Kawano et al., 2009). L'isoforme courte sur laquelle se concentre ces travaux de maîtrise est localisée aux membranes basales des muscles durant la phase embryonnaire et ensuite également aux membranes basales du pharynx, de l'intestin et de la gonade (Kawano et al., 2009).

Par ailleurs, MIG-6 comprend une région conservée en N-terminal nommée la « cassette papilaine », composée d'un domaine thrombospondine type 1 et de régions riches en cystéines (Kramerova et al., 2000; Kawano et al., 2009). La cassette papilaine est conservée dans les ADAMTS (*a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs*), une superfamille d'enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire (Kramerova et al., 2000; Fessler et al., 2004). Cela suggère que MIG-6 pourrait être impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire afin de supprimer les défauts de maintenance *sax-7*.

2.1.3 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est composée de protéines structurales stables ou dynamiques et autres molécules de signalisation intercellulaire. Elle est localisée dans tous les tissus du corps et occupe une variété de rôles dans leur développement et maintenance (Frantz et al., 2010; Amran et al., 2021). Au niveau du cerveau, la matrice extracellulaire représente environ 20 % du volume total (Nicholson and Sykova, 1998). Par ailleurs, les membranes basales représentent un type de matrice extracellulaire spécialisée qui entourent les organes au moyen de composants protéiques formant un réseau dense et mince (Jayadev and Sherwood, 2017). Les principaux composants des membranes basales sont le collagène IV et la laminine, soit des protéines à l'origine de deux réseaux structurels indépendants étant reliés par des protéines comme le nidogène et le perlécan (Figure 10) (Jayadev and Sherwood, 2017).

Chez *C. elegans*, le matrisome qui constitue l'ensemble des protéines sécrétées dans la matrice extracellulaire, représente environ 4 % du génome, similairement aux mammifères (Teuscher et al., 2019). Or, les principales protéines des membranes basales sont encodées par des gènes uniques qui possèdent des orthologues chez les mammifères, facilitant grandement leur étude et faisant en sorte que le nématode représente un modèle idéal pour analyser leurs fonctions *in vivo* (Jayadev and Sherwood, 2017).

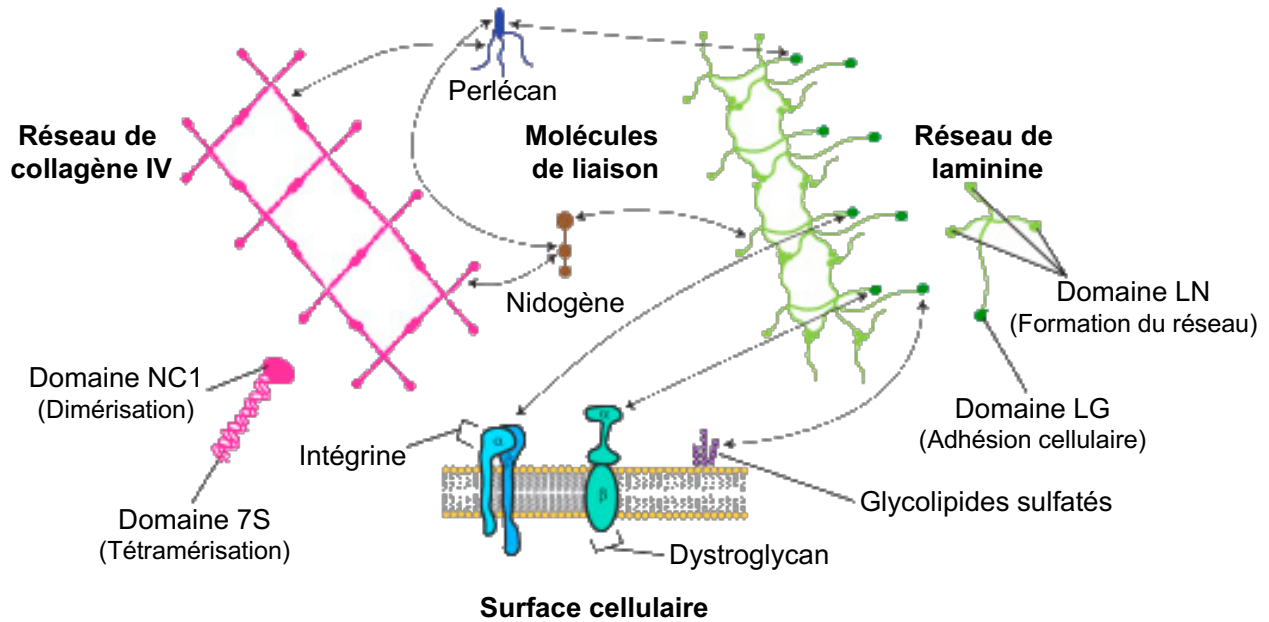


Figure 10. – Principaux composants des membranes basales. Deux réseaux indépendants de collagène IV et de laminine sont reliés par des molécules comme le perlécane et le nidogène et des récepteurs permettent d’associer le réseau de laminine à la surface cellulaire. Image adaptée de Jayadev et Sherwood (2017).

2.1.4 Interaction génétique entre *mig-6*/Papiline et *emb-9*/Collagène IV

Une mutation de *mig-6C* induit des défauts durant la 2^e phase de migration de la cellule de pointe distale lors de la formation de la gonade (Kawano et al., 2009). Ces défauts sont supprimés par une diminution de la quantité de collagène IV ou une diminution de sa sécrétion dans l’espace extracellulaire, indiquant une interaction génétique entre ces deux composants (Kawano et al., 2009). Ces derniers sont aussi présents aux membranes basales des muscles et du pharynx de part et d’autre des structures neuronales désorganisées chez les mutants de maintenance *sax-7*. Le collagène IV est généralement la plus abondante des protéines structurales conférant une stabilité aux structures contre les stress mécaniques pour maintenir l’intégrité des tissus : le rôle antagoniste de MIG-6 pourrait alors être de réguler la flexibilité des membranes basales (Clay and Sherwood, 2015; Nadour et al., en préparation).

2.1.4 Hypothèses

La désorganisation neuronale progressive induite par une mutation nulle du gène *sax-7* est compensée par la perte de fonction du gène *mig-6* (Nadour et al., en préparation). SAX-7 étant un facteur d’adhésion cellulaire et MIG-6, un composant susceptible d’être impliqué dans le

remodelage de la matrice extracellulaire, l'hypothèse de travail est qu'un nouvel équilibre entre les propriétés d'adhésion cellulaire et la flexibilité de la matrice extracellulaire est retrouvé chez les doubles mutants *sax-7; mig-6* (Figure 11A, B). À partir de ce modèle, deux prédictions peuvent être émises :

1) MIG-6 régule l'état de la matrice extracellulaire pour supprimer les défauts de maintenance neuronale *sax-7*;

2) Bien que les mutants *mig-6* ne présentent aucun phénotype des ganglions neuronaux de la tête en condition de cultures normales chez le type sauvage, il se pourrait qu'il en présente dans d'autres contextes étant donné son possible rôle dans le remodelage de la matrice extracellulaire.

2.1.5 Objectifs

2.1.5.1 Caractériser l'état de la matrice extracellulaire chez les mutants *mig-6*

Notre équipe a démontré qu'une déplétion du collagène IV chez les mutants *mig-6* mène à la réapparition partielle des défauts de maintenance neuronale, constituant un premier indice que l'interaction entre MIG-6 et le collagène IV est conservée dans un contexte de maintenance neuronale (Figure 11C) (Nadour et al., en préparation). Mais alors, quel est l'impact d'une perte de fonction de *mig-6* sur l'état de la matrice extracellulaire ? Le premier objectif est donc de caractériser la distribution du collagène IV chez les mutants *mig-6*.

2.1.5.2 Investiguer l'organisation neuronale des mutants *mig-6* en condition de stress mécanique

Les mutants *mig-6* ne présentent pas de défauts d'organisation des ganglions neuronaux de la tête en conditions de cultures normales. Cependant, le stress mécanique étant un facteur important dans l'apparition de défauts de maintenance neuronale, les mutants *mig-6* pourraient présenter un phénotype neuronal différent du type sauvage s'ils sont soumis à un stress mécanique locomoteur plus important. Le second objectif vise donc à étudier cette possibilité en soumettant les vers à une condition de cultivation augmentant l'intensité des stress locomoteurs : la croissance en milieu liquide.

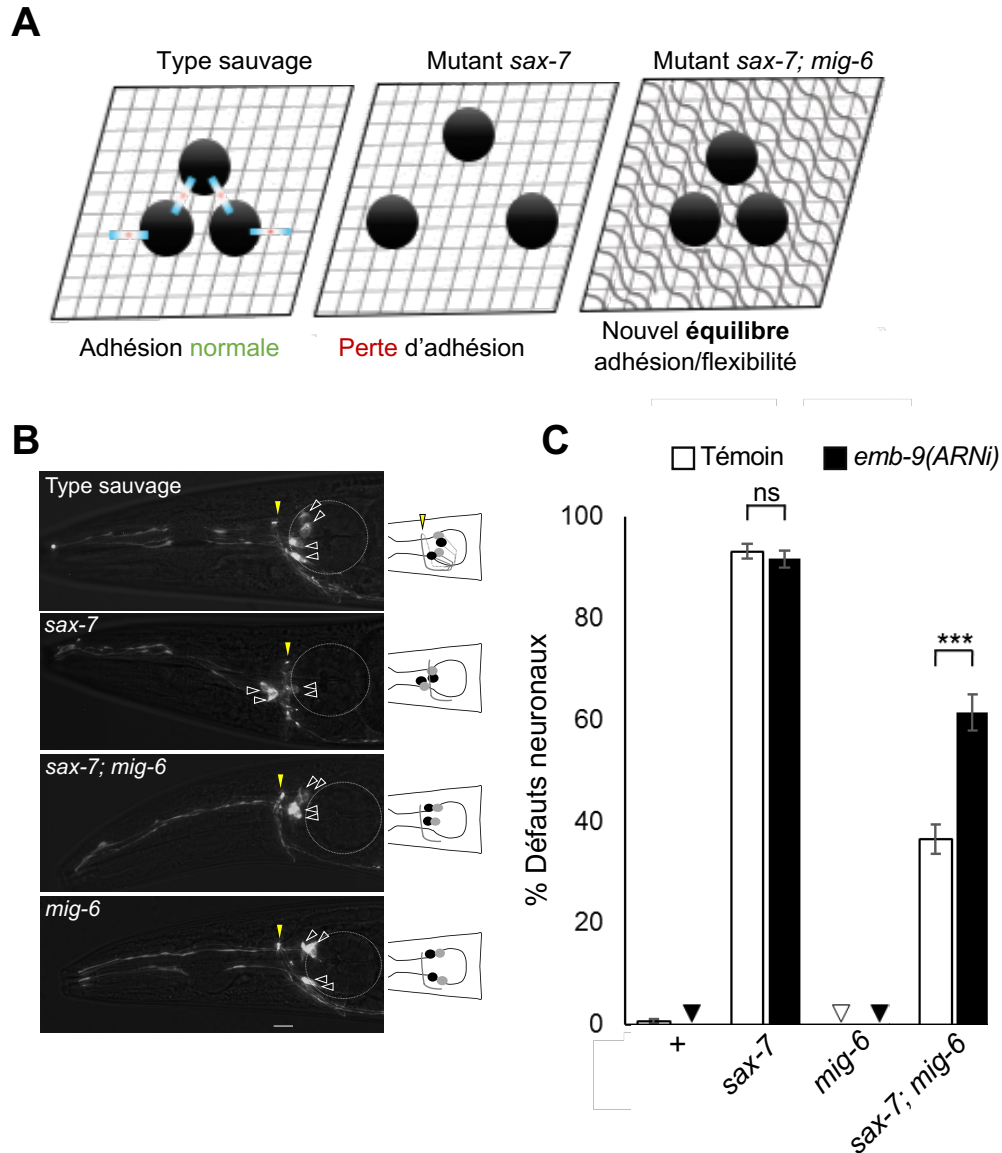


Figure 11. – Hypothèse de travail : l'équilibre entre les forces d'adhésion cellulaire et la flexibilité de la matrice extracellulaire assurerait la maintenance neuronale. (A) (Gauche) Le type sauvage ne présenterait aucune désorganisation neuronale en raison d'une adhésion correcte prodiguée par SAX-7 entre les neurones et leur environnement. (Milieu) Les mutants *sax-7* présenteraient une désorganisation neuronale due à une perte d'adhésion entre les neurones et leur environnement. (Droite) Les doubles mutants *sax-7; mig-6* présenteraient une modification de l'état de la matrice extracellulaire qui compenserait la perte d'adhésion et rétablirait une organisation neuronale correcte. (B) Comparaison de l'organisation des neurones ASH/ASI (pointes de flèches vides) relativement à l'anneau nerveux (pointes de flèches jaunes) des différents mutants au moyen du rapporteur fluorescent *hDIs26* (*Psra-6::DsRed2*). (C) Une déplétion de *emb-9*/collagène IV induit une réapparition partielle des défauts neuronaux chez les doubles mutants *sax-7; mig-6*. Quantification des défauts de maintenance neuronale suite à la déplétion du collagène IV (Proportion \pm erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). La différence significative est indiquée par des astérisques (***) $p \leq 0,001$). ns, non significatif. Images B et C adaptées de Nadour et al. (en préparation).

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Maintien des souches

Les vers ont été cultivés dans un incubateur à 20 °C conformément à la procédure standard, soit sur des boîtes de Pétri contenant du *Nematode Growth Medium* (NGM) ensemencé de *E. coli* OP50 (Brenner, 1974). La souche N2 Bristol constitue le type sauvage de cette étude. Les allèles utilisés sont listés au tableau 1 et les souches, au tableau 2.

Tableau 1. – Liste des allèles utilisés pour l’axe I

Gène	Allèle	Nature de l'allèle	Référence
<i>mig-6</i>	<i>qv33</i>	G664E	Nadour et al. (en prép.)
<i>mig-6</i>	<i>k177</i>	Y650D	Kawano et al. (2009)
<i>mig-6</i>	<i>e1931</i>	Q1814Stop	Hedgecock et al. (1987)
<i>sax-7</i>	<i>qv30</i>	Délétion de 19 973 paires de bases	Desse et al. (2021)

Tableau 2. – Liste des souches utilisées pour l’axe I.

Souche	Génotype	Transgène	Référence
Souches de type sauvage servant de référence			
N2			Brenner (1974)
NK364	<i>unc-119(ed3) III; qyIs46 X</i>	<i>emb-9::mCherry; unc-119(+)</i>	Ihara et al. (2011)
VH648	<i>hdlIs26 II</i>	<i>Podr-2::CFP; Psra-6::DsRed2</i>	Hutter (2003)
Caractérisation du collagène IV			
VQ1573	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(k177) V; qyIs46 X</i>		Nadour et al. (en prép.)
VQ1202	<i>sax-7(qv30) IV; qyIs46 X</i>		Nadour et al. (en prép.)
VQ1176	<i>mig-6(qv33) V; qyIs46 X</i>		Nadour et al. (en prép.)
VQ1570	<i>mig-6(k177) V; qyIs46 X</i>		Nadour et al. (en prép.)
Visualisation des neurones ASH/ASI			
VQ1076	<i>mig-6(qv33) V; hdlIs26 III</i>		Nadour et al. (en prép.)
VQ1077	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdlIs26 III</i>		Nadour et al. (en prép.)
VQ1061	<i>sax-7(qv30) IV; hdlIs26 III</i>		Nadour et al. (en prép.)

2.2.2 Microscopie

Les souches ont été maintenues à 20 °C et bien nourries pendant au moins trois générations avant leur observation. L'âge adulte des vers est déterminé comme suit : l'âge « jour 1 » correspond à 24 heures post-stade larvaire L4, l'âge « jour 2 » correspond à 48 heures post-stade L4, etc.

Les vers ont été immobilisés avec de l'azide de sodium (75 mM) sur une couche d'agarose 5 %, puis recouverts d'une lamelle. L'observation des vers s'est faite au microscope à fluorescence *Zeiss AxioScope A1* ou *Imager M2* muni d'une caméra *AxioCam* permettant la capture d'images traitées par le logiciel *AxioVision*. Le traitement post-expérimental des images a été effectué à l'aide du logiciel *ImageJ* et la déconvolution d'images avec le logiciel *AutoQuant X3*.

2.2.3 Croissance synchronisée en culture liquide

Afin de synchroniser une population de vers, un minimum de cinq plaques présentant une forte proportion d'embryons et d'hermaphrodites gravides ont été lavées deux fois avec 600 µL d'eau miliQ tout en décollant les embryons avec une pipette Pasteur repliée. La suspension recueillie dans un tube de 15 mL sur glace a été centrifugée à la vitesse 4 (~1300 rpm) d'une centrifugeuse clinique *International Equipment Company*, puis le surnageant a été retiré et le culot (~500 µL) a été transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Ce dernier a ensuite été centrifugé deux minutes à 2000 rpm, puis le surnageant a été éliminé. Au culot d'environ 150-200 uL de volume ont été ajoutés 200 µL d'hypochlorite de sodium (6 % p/v) et 500 µL d'hydroxyde de sodium (1 M). La suspension a été mélangée pendant six minutes pour laisser agir la solution. En effet, seuls les larves et les vers adultes sont affectés, entraînant le relâchement des embryons qui eux sont protégés par une coquille matricielle et donc résistent au traitement. Par la suite, un lavage avec 1 mL d'eau miliQ suivi de trois lavages avec du S médium (Stiernagle, 2006) ont été effectués. Le culot d'embryons a été resuspendu dans 2 mL de S médium puis transféré dans un flacon de 15 mL afin d'assurer une oxygénation suffisante. Ce dernier a été incubé à 20 °C sur un *Nutator* durant une nuit complète.

Le lendemain, le milieu liquide des vers synchronisés en stade d'arrêt L1 a été enrichi de 200 µL de suspension de *E. coli* OP50 concentrée. Les vers ont pu poursuivre leur développement en culture liquide et sont restés sur le *Nutator* à 20 °C jusqu'à leur observation neuroanatomique (Figure 12A).

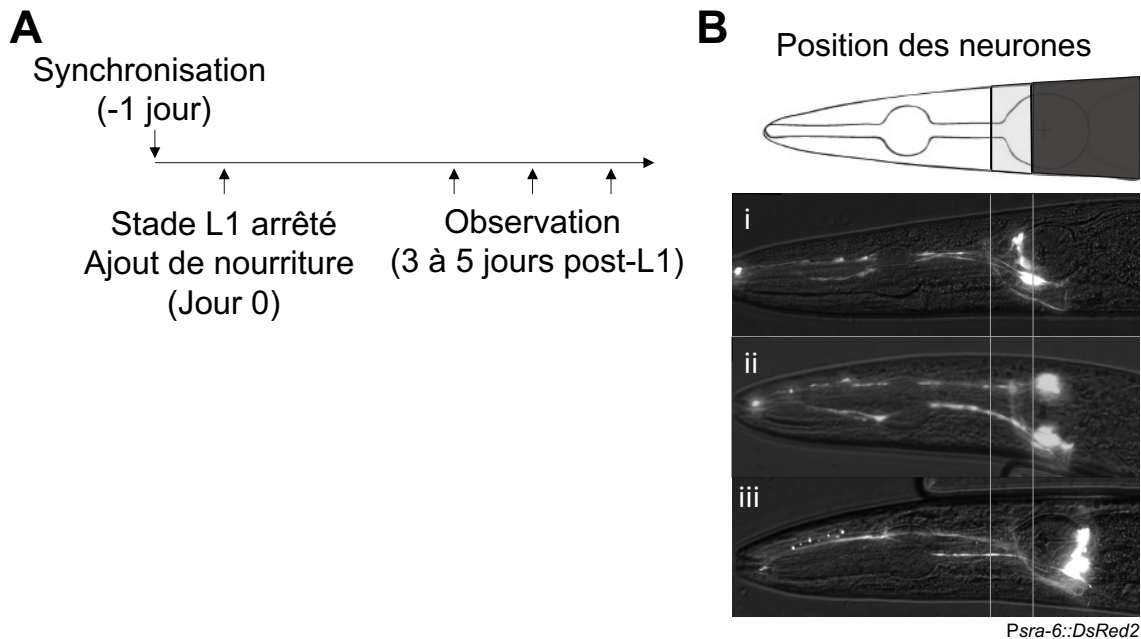


Figure 12. – Résumé des expériences en condition de stress mécanique. (A) Schématisation du déroulement des expériences de cultivation des vers en milieu liquide. (B) Catégorisation de la position neuronale. Zone gris pâle : position normale des neurones. Zone gris foncé : neurones déplacés postérieurement. Des exemples d'images de microscopie à fluorescence sont fournis pour illustrer une position correcte et un déplacement postérieur des neurones. Les neurones ASH/ASI ont été visualisés avec le rapporteur *hdIs26* (*Psra-6::DsRed2*).

2.2.4 ARNi en culture liquide

-3 jours – Préparation des bactéries

Des bactéries *E. coli* HT115(DE3) transformées avec le vecteur L4440 vide ou contenant une portion codante de la séquence K04H4.1 du gène *emb-9* ont été étalées sur une plaque d'agar contenant de l'ampicilline (75 µg/mL) et de la tétracycline (12,5 µg/mL). Les plaques ont été incubées à 37 °C durant une nuit.

-2 jours – Préparation des bactéries

Une colonie isolée par clone a été inoculée dans 1 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline (75 µg/mL) et de la tétracycline (12,5 µg/mL) à 37 °C sous agitation durant une nuit.

-1 jour – Préparation des bactéries et synchronisation des vers

Le même protocole de synchronisation qu'au point 2.2.3 a été employé. Le S médium utilisé a été supplémenté d'ampicilline (100 µg/mL) et d'IPTG (1 mM).

Des cultures bactériennes de 45 mL par clone ont été préparées dans du milieu LB contenant de l'ampicilline (75 µg/mL) et incubées à 37 °C sous agitation durant 14 heures.

Jour 0 – Préparation et ajout des bactéries aux cultures liquides

Après 14 heures d'incubation, de l'IPTG (5 mM) a été ajouté aux cultures avant de poursuivre l'incubation pendant 4 heures supplémentaires à 37 °C sous agitation. Les cultures bactériennes ont ensuite été centrifugées à 5000 rpm pendant dix minutes à 4 °C, puis la majorité du surnageant a été éliminée pour ne garder que 5 mL de bactéries concentrées. Ensuite, 400 µL de concentré de bactéries ont été ajoutés aux synchronisations de vers en culture liquide. Chaque génotype étudié comportait un groupe témoin nourri avec de la bactérie transformée avec le vecteur vide et un groupe subissant l'ARNi contre *emb-9*. Les cultures liquides ont été incubées à 20°C sous agitation (*Nutator*) jusqu'à leur observation. Le reste des bactéries concentrées a été conservé à 4 °C.

Jour 3 – Ajout de bactéries aux cultures liquides

Pour assurer une meilleure efficacité de l'ARNi et une ample présence de nourriture, de l'IPTG (1 mM) et 250 µL de concentré de bactéries ont été ajoutés aux cultures liquides.

Jour 5 – Observation

Les cultures liquides ont été décantées 10 minutes, puis 250 µL ont été prélevés du fond des flacons et déposés sur des plaques contenant du NGM nonensemencé.

2.2.5 ARNi en culture solide

Un protocole similaire à l'ARNi en culture liquide (2.2.4) a été employé. À noter que du M9 a été utilisé pour les lavages lors des synchronisations et que les larves synchronisées ont été cultivées sur des plaques NGM supplémentées d'ampicilline (75 µg/mL) et d'IPTG (1 mM) et ensemencées avec de la bactérie concentrée. Cette dernière a été incubée 16 heures plutôt que 14 heures, puis de l'IPTG (1 mM) a été ajouté avant de poursuivre l'incubation 1 heure supplémentaire à 37 °C plutôt que 4 heures. L'observation des vers s'est faite au jour 2 d'âge adulte.

2.2.6 Analyses neuroanatomiques

Position des corps cellulaires des neurones ASH et ASI

Les vers ont été observés en vue latérale. Quatre neurones sensoriels ASH (droit et gauche) et ASI (droit et gauche) ont été visualisés à 40X avec le rapporteur *hdIs26* (*Psra-6::DsRed2*). L'âge auquel les vers ont été observés est indiqué dans les légendes des figures. Pour la quantification des défauts de maintenance *sax-7*, tout animal comportant au moins un neurone qui touchait, chevauchait ou dépassait antérieurement l'anneau nerveux était considéré défectueux. Pour la quantification du déplacement neuronal lié au stress mécanique, la position des corps cellulaires a été notée relativement au bulbe terminal du pharynx en fonction des zones illustrées à la figure 12B.

2.2.7 Analyses du collagène IV

Les vers ont été observés en vue latérale. Le collagène IV au niveau de la tête des vers a été visualisé à 40X avec le rapporteur *qyIs46* (*Pemb-9::emb-9::mCherry*). L'âge auquel les vers ont été observés est indiqué dans les légendes des figures. Toutes les images ont été acquises selon les mêmes paramètres et traitées en LUT inversé sur *ImageJ*.

Quantification des structures fibrotiques

Une première évaluation des photos a permis d'identifier les animaux présentant au moins une structure fibrotique au niveau du bulbe terminal du pharynx. Une seconde évaluation à l'aveugle a été effectuée par un autre membre du laboratoire afin de confirmer les résultats obtenus. L'utilisation de méthodes de quantification plus objectives a été tentée, mais elles se sont avérées imparfaites (voir section 5.1 en annexe).

Quantification d'intensité de fluorescence totale

Une région d'intérêt a été tracée autour de la tête des vers. La longueur de la tête a été déterminée comme étant 120 % de la longueur entre la pointe antérieure du *procorpus* et l'extrémité bulbe terminal. La mesure de la densité intégrée de cette région a été mesurée sur *ImageJ* et l'intensité du bruit de fond a été soustraite de cette mesure à partir de l'intensité de fluorescence moyenne de quatre régions rectangulaires de 24,851 pixels carrés, donnant la fluorescence totale corrigée.

2.2.8 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel R. Les résultats des figures sont exprimés en proportions \pm erreur standard de la proportion ou en moyennes \pm erreur standard de la moyenne. Des tests exacts de Fisher ont été effectués pour comparer les proportions et les valeurs-p ont été ajustées pour comparaisons multiples (correction Bonferroni). Des tests de Student ont servi à comparer deux moyennes. Des analyses de variances à un facteur (ANOVA) ont été performées pour comparer plus de deux moyennes si les conditions d'application étaient respectées et des tests post-hoc avec ajustement pour comparaisons multiples (correction Bonferroni) ont été effectués. Dans le cas où les conditions d'application n'étaient pas respectées, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi de tests post-hoc avec ajustement pour comparaisons multiples ont été effectués (correction Bonferroni). Les valeurs-p ont été considérées significatives lorsque $< 0,05$ (*), $0,01$ (**) ou $0,001$ (***).

2.3 Résultats

2.3.1 Altération de la matrice extracellulaire chez les mutants *mig-6*

Afin d'étudier l'état de la matrice extracellulaire chez les mutants *mig-6*, l'analyse s'est concentrée sur le composant structurel conservé le plus abondant des membranes basales : le collagène IV. Pour ce faire, la construction de souches avec un rapporteur fluorescent traductionnel d'EMB-9/Collagène IV a préalablement été effectuée par l'étudiante au doctorat Malika Nadour et moi-même afin de caractériser la distribution du collagène IV chez divers mutants.

L'analyse du collagène IV au stade jeune adulte et jour 2 d'âge adulte a permis d'observer de petites accumulations sphériques davantage présentes chez les mutants *mig-6* que chez le type sauvage à l'âge adulte, mais également la présence de structures allongées, dénotées ici comme « structure fibrotiques », au niveau du bulbe terminal du pharynx chez les mutants *mig-6(qv33)* comparativement au type sauvage (Figure 13). L'apparition des structures fibrotiques dénote un remodelage ou un état altéré de la matrice extracellulaire à la suite d'une perte de fonction de *mig-6*. Ce phénotype est confirmé par l'étude d'un autre allèle, *k177*, qui induit également une perte de fonction de *mig-6* (Figures 9C, 13).

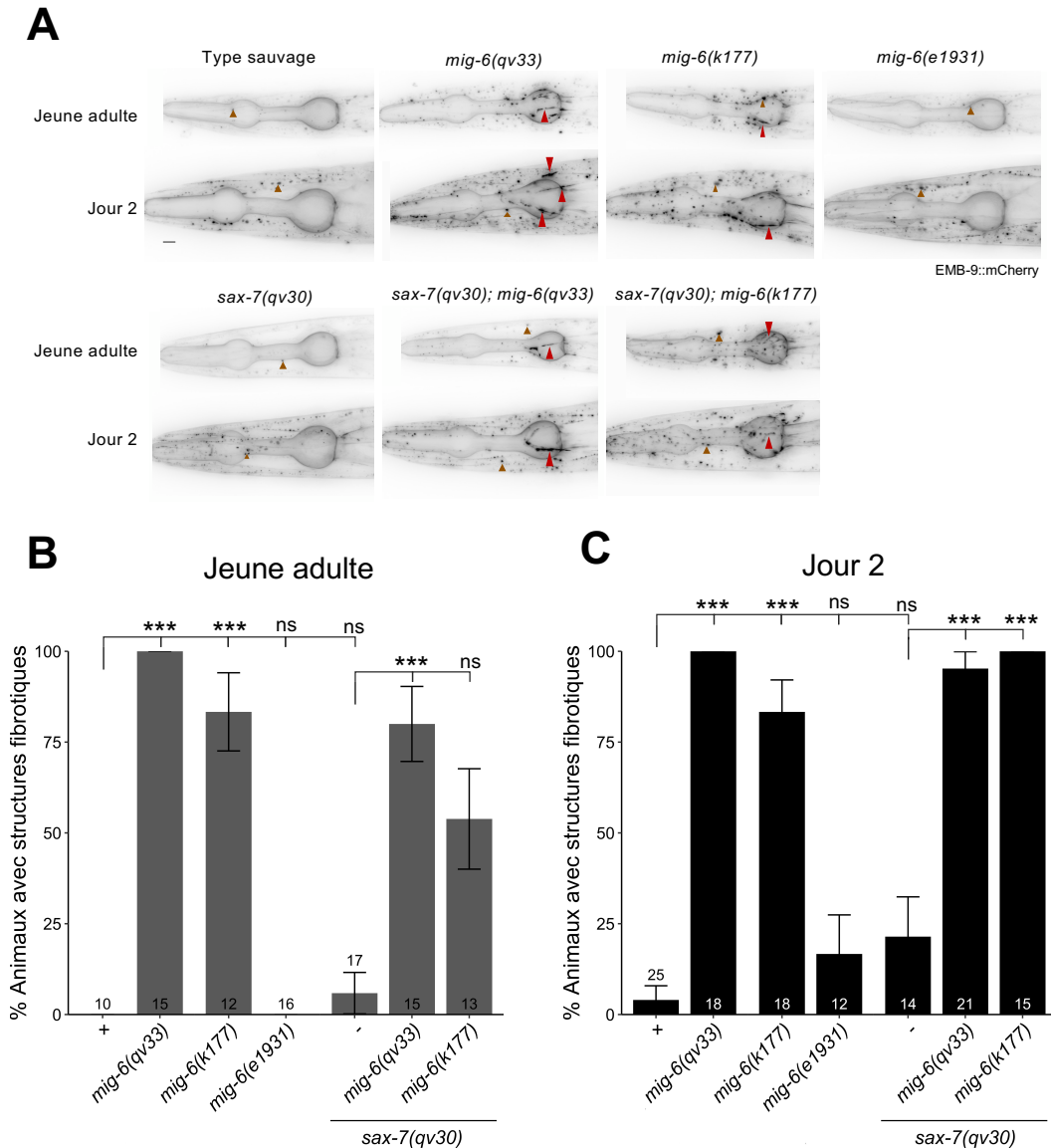


Figure 13. – L'état de la matrice extracellulaire est altéré chez les mutants *mig-6*. (A) Visualisation du collagène IV avec le rapporteur *qyIs46* (EMB-9::mCherry) au stade jeune adulte et au jour 2 d'âge adulte. Les accumulations sphériques de collagène IV sont dénotées par des pointes de flèches brunes et les structures fibrotiques par des pointes de flèches rouges. (B) Quantification des animaux au stade jeune adulte présentant des structures fibrotiques. (C) Quantification des animaux au jour 2 d'âge adulte présentant des structures fibrotiques (Proportion \pm erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). Les tailles d'échantillons sont indiquées sur les abscisses. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (***) $p \leq 0,001$. ns, non significatif. Échelle = 10 μm .

Par ailleurs, puisque MIG-6 se présente en deux isoformes, l'allèle *e1931* engendrant spécifiquement une perte de fonction de la longue isoforme a permis de vérifier si cette dernière jouait un rôle dans la formation des structures fibrotiques au niveau du bulbe terminal du pharynx (Figures 9C, 13). Aucune différence significative entre le nombre d'animaux *mig-6(e1931)* présentant des structures fibrotiques et le type sauvage n'est présente, indiquant que la longue isoforme n'intervient pas dans le processus de remodelage du collagène IV au niveau de la tête des vers et suggère davantage un rôle de l'isoforme courte dans ce processus.

De plus, ces structures fibrotiques sont également présentes chez les doubles mutants *sax-7(qv30); mig-6(qv33)* dont l'architecture neuronale est préservée, mais pas chez les simples mutants *sax-7(qv30)* présentant quant à eux des défauts de maintenance de l'organisation neuronale (Figure 13). Cela appuie l'idée qu'une modification de l'état de la matrice extracellulaire induite par la perte de fonction de *mig-6C* pourrait être impliquée dans la suppression des défauts de maintenance d'architecture neuronale *sax-7*.

2.3.2 Déplétion du collagène IV chez les mutants *mig-6*

Une déplétion post-développementale du collagène IV par ARNi entraîne un retour des défauts de maintenance chez les doubles mutants *sax-7; mig-6* (voir figure 11C) (Nadour et al., en préparation). Autrement dit, diminuer les niveaux de collagène IV prévient la suppression des défauts de maintenance des mutants *sax-7* normalement conférée par la perte de fonction de *mig-6*. Une analyse de la présence des structures fibrotiques a été menée en condition d'ARNi contre *emb-9*/Collagène IV pour vérifier si cette réapparition des défauts de maintenance pouvait être corrélée à une absence de remodelage de la matrice extracellulaire.

Les animaux ayant subi l'ARNi contre le collagène IV présentent une diminution de l'intensité de fluorescence totale au niveau de la tête, indiquant que l'ARNi a été efficace (Figure 14A, B). En plus de cette réduction apparente de collagène IV, la quantification d'animaux présentant des structures fibrotiques révèle une diminution significative chez les vers ayant subi l'ARNi comparativement au groupe témoin, et ce, tant chez les mutants *mig-6(qv33)* que chez les doubles mutants *sax-7(qv30); mig-6(qv33)* (Figure 14A, C). Ces résultats suggèrent que le fait de diminuer la production de collagène IV supprime également le remodelage de la matrice extracellulaire normalement perçu chez les mutants *mig-6*.

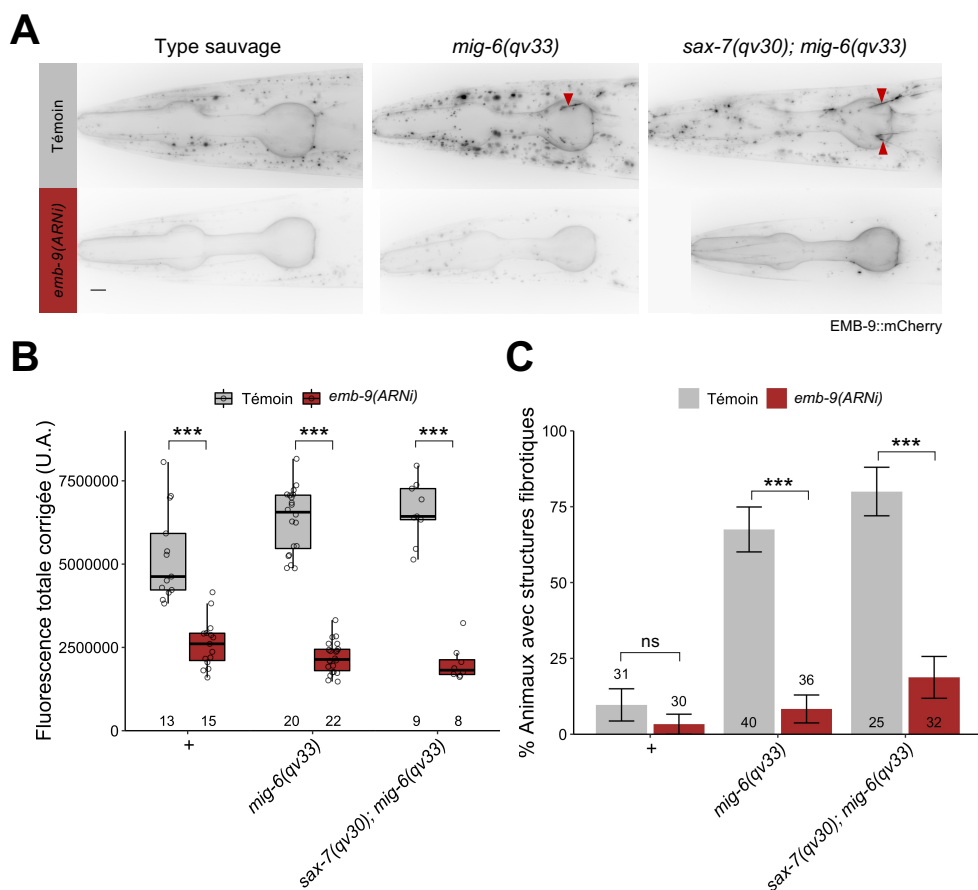


Figure 14. – La présence de structures fibrotiques chez les mutants *mig-6* dépend des niveaux de collagène IV. (A) Visualisation du collagène IV avec le rapporteur *qyls46* (EMB-9::mCherry) au jour 2 d'âge adulte. Les structures fibrotiques sont dénotées par des pointes de flèches rouges. (B) Quantification de la fluorescence totale au niveau de la tête des animaux (Boîtes à moustaches avec points individuels, tests de Student). (C) Quantification des animaux au jour 2 d'âge adulte présentant des structures fibrotiques (Proportion \pm erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher). Les tailles d'échantillons sont indiquées sur les abscisses. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (***) $p \leq 0,001$. ns, non significatif. Échelle = 10 μ m.

2.3.3 Impact d'un stress mécanique accru sur l'organisation neuronale

En plus de son rôle révélé comme antagoniste des effets du gène *sax-7* sur la maintenance neuronale, il se pourrait qu'une perte de fonction de *mig-6* par elle-même puisse impacter l'architecture neuronale étant donné son rôle déterminant l'état de la matrice extracellulaire tel que décrit plus haut. Bien qu'aucun défaut neuronal ne soit apparent chez les simples mutants *mig-6* en conditions de cultures usuelles, une condition de stress mécanique accru a été employée pour tester si la perte de fonction de *mig-6* pouvait influencer l'architecture neuronale dans ce contexte. Pour ce faire, une population de vers synchronisés a été cultivée en milieu liquide, où les nématodes

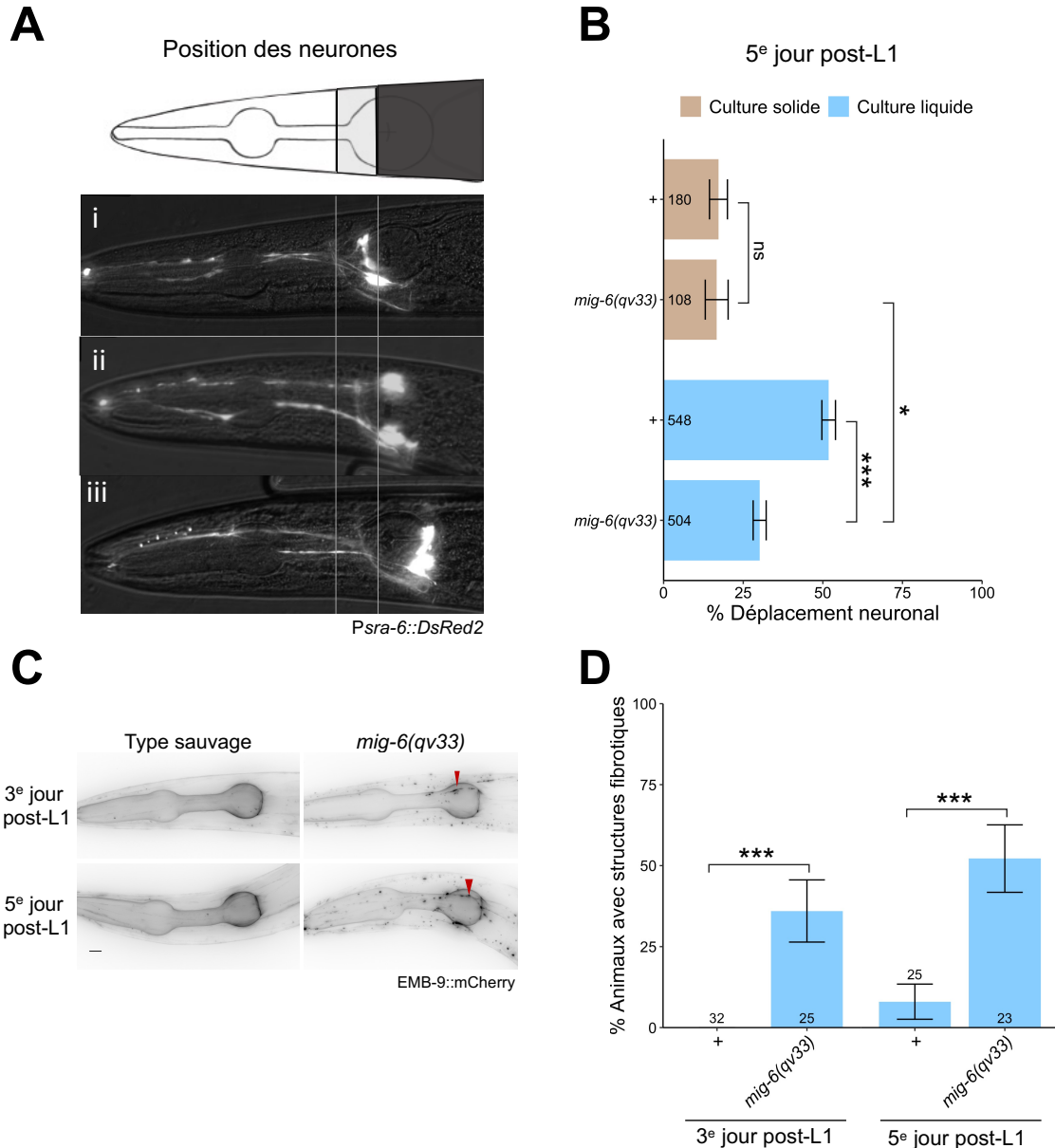


Figure 15. – Impact d’un stress mécanique sur l’organisation neuronale. (A) Rappel de la catégorisation de la position neuronale. Zone gris pâle : position normale des neurones. Zone gris foncé : neurones déplacés postérieurement. Des exemples d’images de microscopie à fluorescence sont fournis pour illustrer une position correcte (i) et un déplacement postérieur des neurones (ii-iii). Les neurones ASH/ASI ont été visualisés avec le rapporteur *hdIs26* (*Psra-6::DsRed2*). (B) Quantification des neurones déplacés postérieurement au 5^e jour post-L1 à la suite d’une cultivation sur milieu solide (beige) ou liquide (bleu) (Proportion \pm erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). (C) Visualisation du collagène IV avec le rapporteur *qyIs46* (*EMB-9::mCherry*) aux 3^e et 5^e jours post-L1 à la suite d’une cultivation en milieu liquide. Les structures fibrotiques sont dénotées par des pointes de flèches rouges. (D) Quantification des animaux aux 3^e et 5^e jours post-L1 à la suite d’une cultivation en milieu liquide présentant des structures fibrotiques (Proportion \pm erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher). Les tailles d’échantillons sont indiquées sur les axes. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$). ns, non significatif. Échelle = 10 μ m.

adoptent un comportement de locomotion différent qu'en culture solide, soit la nage. L'idée derrière ce paradigme expérimental est qu'en nageant frénétiquement avec des mouvements dits de *trashing*, l'organisme fait face à un stress mécanique plus important que s'il se déplaçait en rampant sinusoïdalement comme c'est le cas en culture solide (Korta et al., 2007; Fang-Yen et al., 2010; Laranjeiro et al., 2017).

La position des neurones sensoriels ASH et ASI relativement au bulbe postérieur du pharynx a été examinée au 5^e jour post-L1 (Figure 15B), c'est-à-dire, au 5^e jour après la synchronisation en 1^{er} stade larvaire. En milieu solide, aucune différence n'est présente quant à la position des neurones chez les mutants *mig-6* comparativement au type sauvage (Figure 14B). Cependant, une augmentation significative du nombre de neurones déplacés postérieurement survient lorsque les animaux sont cultivés en milieu liquide, ce qui suggère que le stress mécanique engendre un déplacement neuronal. Fait intéressant à souligner, ce déplacement postérieur est plus prononcé chez le type sauvage que chez les mutants *mig-6*, indiquant que *mig-6* possède un rôle protecteur contre ce déplacement. Il est à noter que les vers cultivés en milieu liquide étaient plus longs et minces que ceux cultivés en milieu solide (données non présentées).

Pour vérifier l'état de la matrice extracellulaire dans ces conditions de stress mécanique, le collagène IV a été visualisé avec un rapporteur traductionnel de ce composant chez les vers ayant grandi en culture liquide jusqu'au 3^e et 5^e jours post-L1 (Figure 15C). Similairement aux observations faites sur les animaux cultivés sur milieu solide, les mutants *mig-6* possèdent des structures fibrotiques au niveau du bulbe terminal du pharynx en culture liquide (Figure 15C, D). Ceci suggère qu'une modification de l'état de la matrice extracellulaire pourrait être à l'origine de la résilience des structures neuronales observée chez les mutants *mig-6* en condition de stress mécanique. Ces résultats mettent en évidence le rôle de l'organisation de la matrice extracellulaire comme facteur impliqué dans la maintenance de l'architecture du système nerveux.

2.3.4 Déplétion du collagène IV en condition de stress mécanique

Dans l'optique de confirmer que les niveaux de collagène IV sont effectivement importants chez les mutants *mig-6* pour préserver l'architecture neuronale contre un déplacement postérieur en culture liquide, une expérience d'ARNi contre collagène IV a été menée.

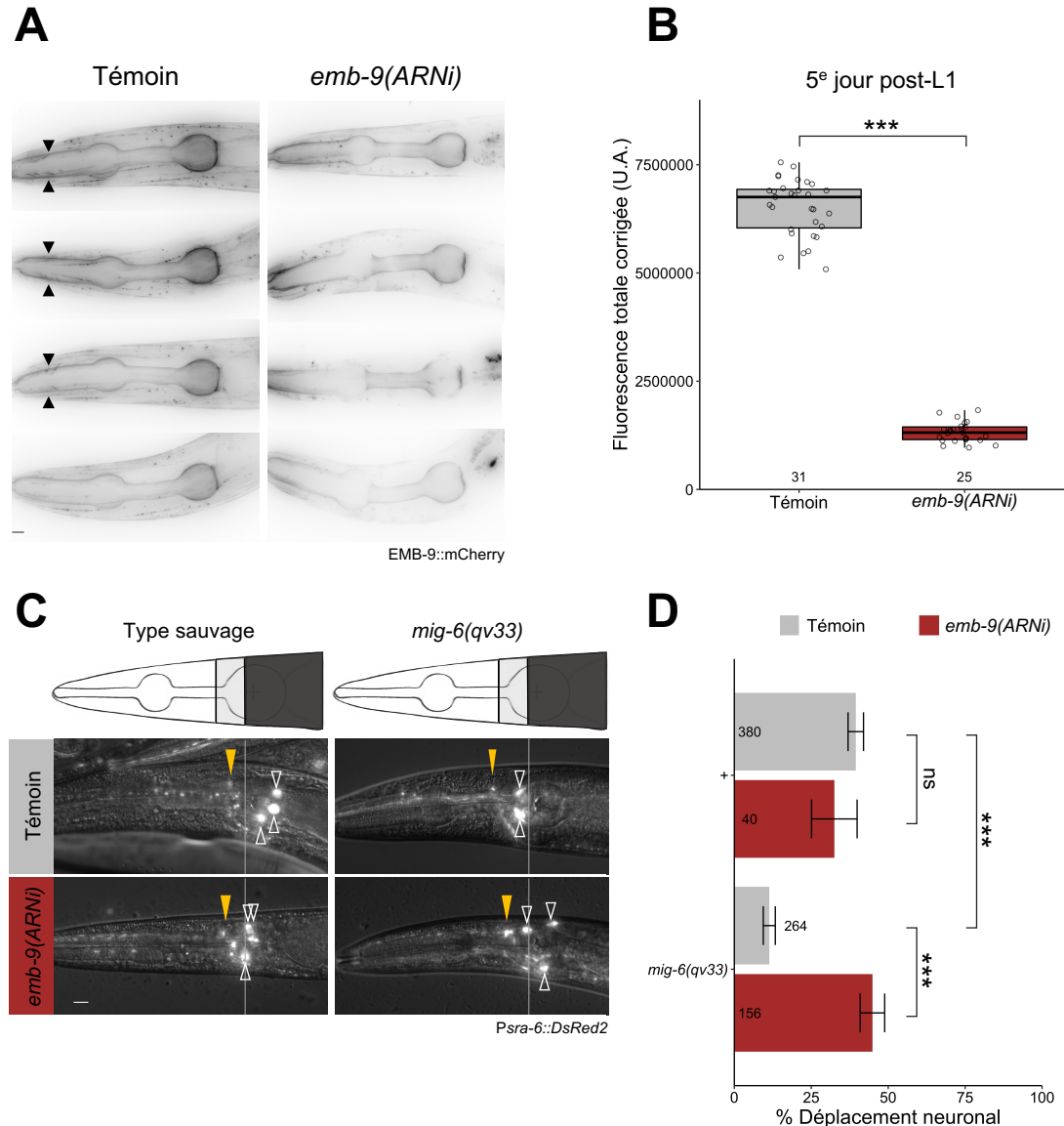


Figure 16. – Les niveaux de collagène IV sont importants pour prévenir le déplacement neuronal en culture liquide. (A) Visualisation du collagène IV avec le rapporteur *gyIs46* (EMB-9::mCherry) au 5^e jour post-L1 chez le type sauvage cultivé en milieu liquide. De fines accumulations de collagène IV sont visibles au niveau de la partie antérieure du *procorpus* (pointes de flèches noires). (B) Quantification de la fluorescence totale au niveau de la tête des animaux cultivés en milieu liquide (Boîtes à moustaches avec points individuels, test de Student). (C) Visualisation de la position des neurones ASH/ASI (pointes de flèches vides) avec le rapporteur *hdIs26* (*Psra-6::DsRed2*) au 5^e jour post-L1 à la suite d'une cultivation en milieu liquide. La position de l'anneau nerveux est indiquée par une pointe de flèche jaune. (D) Quantification des neurones déplacés postérieurement au 5^e jour post-L1 à la suite d'une cultivation en milieu liquide (Proportion \pm erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). Les tailles d'échantillons sont indiquées sur les axes. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (***) $p \leq 0,001$. ns, non significatif. Échelles = 10 μ m.

Premièrement, l'efficacité de l'ARNi a été confirmée en quantifiant l'intensité de fluorescence du rapporteur du collagène IV au niveau de la tête des vers où une diminution de l'intensité de fluorescence a été observée chez les animaux ayant subi l'ARNi comparativement au groupe témoin (Figure 16A, B). Par ailleurs, un point intéressant à noter est l'apparition de fines accumulations de collagène IV en forme d'arrêtes de poisson au niveau du *procorpus* antérieur des vers du groupe témoin. Deuxièmement, la quantification du déplacement des neurones sensoriels ASH et ASI indique à nouveau qu'une perte de fonction de *mig-6* préserve mieux l'architecture neuronale en culture liquide que chez le type sauvage. Cependant, une déplétion post-développementale du collagène IV annule entièrement cet effet, dénoté par une augmentation significative du déplacement postérieur chez les mutants *mig-6* ayant subi l'ARNi comparativement au groupe témoin (Figure 16C, D). La préservation de la position neuronale observée chez les mutants *mig-6* en condition de stress mécanique accru dépend donc des niveaux de collagène IV. À noter que de plus faibles tailles d'échantillon ont été obtenues pour les conditions d'ARNi contre le collagène IV, car une grande proportion de vers éclataient dû à une rupture de la gonade, consistant avec ce qui avait été rapporté dans la littérature (Jayadev et al., 2019).

2.3.5 Impact du stress mécanique sur les défauts de maintenance *sax-7*

En culture solide, la mutation *mig-6(qv33)* agit comme suppresseur des défauts de maintenance *sax-7*. Est-ce toujours le cas en culture liquide? Les défauts de maintenance sont-ils exacerbés, ou au contraire, diminués chez les mutants *sax-7*? Pour aborder ces questions, la position neuronale des neurones sensoriels ASH et ASI a été quantifiée en condition de stress mécanique au 4^e jour post-L1.

Concernant les défauts de maintenance de l'organisation neuronale, soit le pourcentage de chevauchement ou dépassement d'au moins un neurone sensoriel relativement à l'anneau nerveux, les mutants *sax-7* présentent une forte pénétrance des défauts de maintenance en milieu solide contrairement au type sauvage, tel qu'attendu (Figure 17A, B). Similairement, les mutants *sax-7* ayant été cultivés en milieu liquide présentent également des défauts d'organisation des neurones sensoriels. À noter que la pénétrance de ces défauts en culture liquide est légèrement plus faible qu'en culture solide. Les doubles mutants *sax-7; mig-6* présentent une réduction significative des

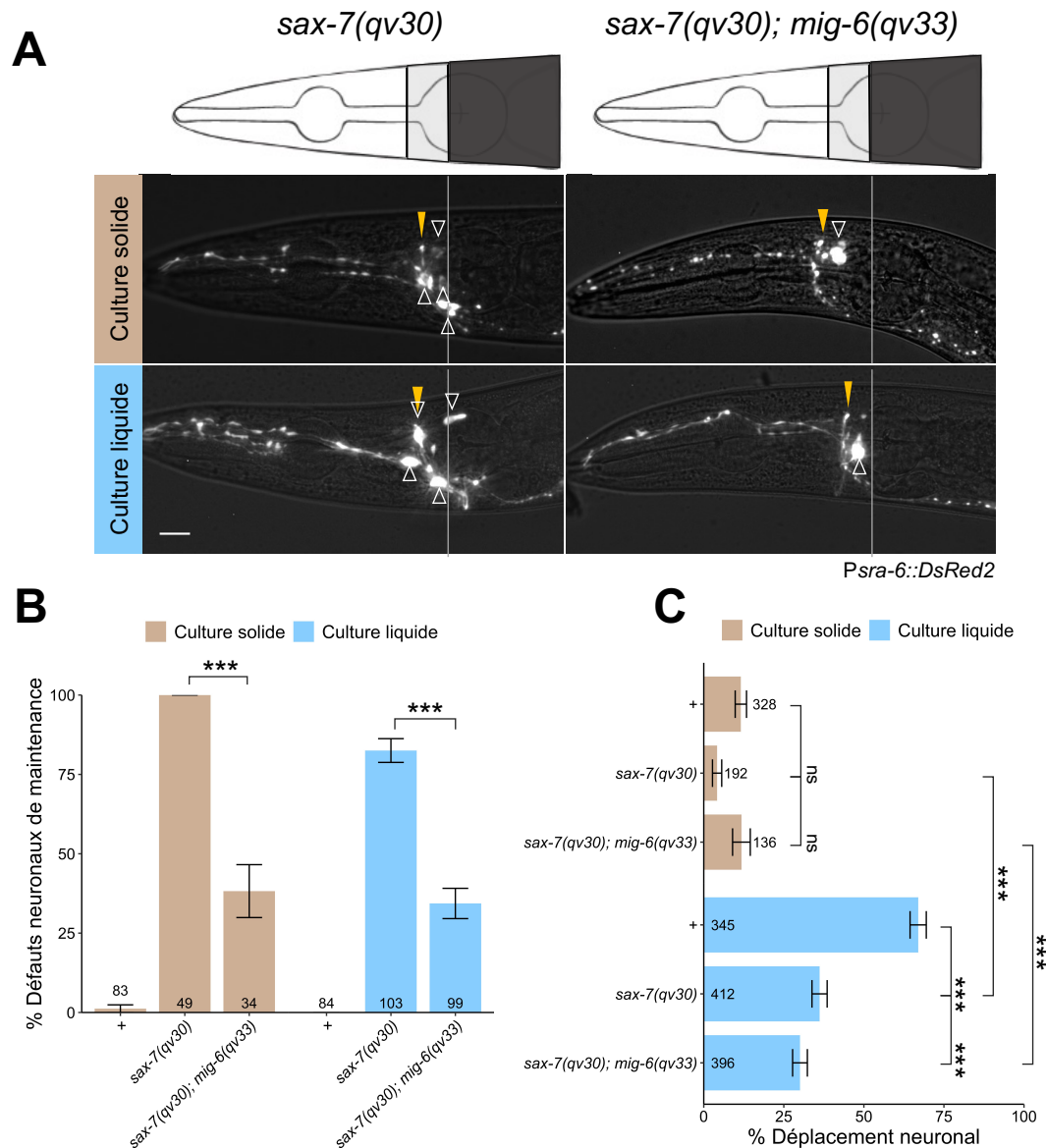


Figure 17. – Observation des structures neuronales des mutants *sax-7* en culture liquide. (A) Visualisation de la position des neurones ASH/ASI (pointes de flèches vides) avec le rapporteur *hdIs26* (*Psra-6::DsRed2*) au 4^e jour post-L1 à la suite d’une cultivation sur milieu solide (beige) ou liquide (bleu). La position de l’anneau nerveux est indiquée par une pointe de flèche jaune. (B) Quantification des animaux présentant une désorganisation des neurones relativement au neuropile (si les somas des neurones se trouvent juste au niveau du neuropile dans l’axe antéro-postérieur, le chevauchent ou sont antérieurs au neuropile) au 4^e jour post-L1 post-L1 à la suite d’une cultivation sur milieu solide (beige) ou liquide (bleu) (Proportion ± erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). (C) Quantification des neurones déplacés postérieurement au 5^e jour post-L1 à la suite d’une cultivation sur milieu solide (beige) ou liquide (bleu) (Proportion ± erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). Les tailles d’échantillons sont indiquées sur les axes. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (***) $p \leq 0,001$. ns, non significatif. Échelle = 10 μ m.

défauts de maintenance neuronale en culture solide, et cette dernière est conservée en condition de stress mécanique. Cela indique que *mig-6(qv33)* maintient son rôle de suppresseur de défauts de maintenance malgré une charge de stress mécanique plus importante.

En ce qui a trait au déplacement postérieur neuronal, sur milieu solide, aucune différence significative n'a été détectée entre les génotypes. Cependant, les doubles mutants *sax-7; mig-6* ont significativement moins de neurones déplacés postérieurement comparativement au type sauvage en culture liquide (Figure 17A, C). Contre toute attente, les simples mutants *sax-7* présentent également une diminution du déplacement postérieur neuronal en culture liquide comparativement au type sauvage. En résumé, ces résultats révèlent que tant les simples mutants *sax-7* que les doubles mutants *sax-7; mig-6* voient leurs neurones protégés contre un déplacement postérieur en condition de culture liquide.

2.4 Discussion

Le système nerveux est mis à l'épreuve de plusieurs façons après son assemblage initial lors de l'embryogenèse. Croissance, maturation, incorporation de nouveaux neurones, accidents et autres stress mécaniques sont quelques-uns des facteurs susceptibles d'altérer l'architecture du système tout au long de la vie. Les mécanismes de protection à long terme du système nerveux contre ces stress étant peu connus, la première partie de ces travaux visait à approfondir comment la perte de fonction de *mig-6*/Papiline supprime des défauts de maintenance neuronale des mutants *sax-7/L1CAM*. L'observation du collagène IV, un composant structurel important des membranes basales, ainsi que sa déplétion post-développementale, a permis de démontrer que *mig-6* exerce sa fonction de suppresseur de défauts neuronaux en régulant l'environnement périneuronal. Ainsi, un état altéré de la matrice extracellulaire a été associé avec une meilleure résilience de l'organisation neuronale chez les mutants de maintenance *sax-7/L1CAM* et en condition de haut stress mécanique. L'ensemble des résultats appuie l'idée qu'un équilibre entre des facteurs d'adhésion et la flexibilité de la matrice extracellulaire est important pour la maintenance à long terme du système nerveux.

Dans cette section, les interactions moléculaires de *mig-6* pour rétablir l'organisation neuronale, l'influence d'une croissance en culture liquide sur les phénotypes observés et certaines perspectives du projet seront abordés. Enfin, un point de vue de biomécanique sera adopté pour redéfinir l'hypothèse de travail.

2.4.1 Interacteurs de *mig-6* pour supprimer les défauts neuronaux

La perte de fonction du gène *mig-6* affecte la distribution du collagène IV menant à la formation de structures fibrotiques, et entraîne le rétablissement de l'architecture neuronale des mutants *sax-7*. Cela mène à se questionner quant aux différents facteurs pouvant être impliqués dans ce processus. Ces travaux de maîtrise s'inscrivant dans un projet plus large, d'autres gènes ont précédemment été identifiés comme interagissant génétiquement avec *mig-6*.

2.4.1.1 Interacteurs génétiques connus pour la maintenance neuronale

mig-17/ADAMTS

mig-17 encode une métalloprotéase ADAMTS sécrétée dans la matrice extracellulaire qui interagit avec *mig-6* dans la deuxième phase de migration de la cellule de pointe distale lors de la formation de la gonade (Kawano et al., 2009). Il est connu que les protéines de la famille des ADAMTS sont impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire, particulièrement en dégradant des protéoglycanes et collagènes (Ihara and Nishiwaki, 2007; Krishnaswamy et al., 2019). De manière intéressante, une perte de fonction du gène *mig-17* mène également à l'apparition de structures fibrotiques de collagène IV près du bulbe postérieur du pharynx ainsi qu'une suppression des défauts de maintenance *sax-7*, similairement à ce qui a été démontré chez les mutants *mig-6* (Nadour et al., en préparation). Ces travaux révèlent aussi que *mig-6* et *mig-17* agissent dans la même voie moléculaire pour supprimer les défauts de *sax-7*, et que la perte de fonction de *mig-6* entraîne une augmentation et un changement de la distribution de MIG-17 au niveau de la tête des vers, ce qui est consistant avec l'idée que MIG-6 serait impliquée dans la régulation de la localisation de MIG-17 aux membranes basales (Kawano et al., 2009). En revanche, il n'est pas connu si cette interaction avec MIG-6 est directe ou indirecte et le(s) substrat(s) de MIG-17 n'ayant pas encore été identifié, MIG-17 agit-elle directement sur le remodelage du collagène IV ? L'étude d'interactions protéine-protéine extracellulaires constituant encore un défi, des expériences de co-immunoprécipitation ou de transfert d'énergie de résonance

par fluorescence (FRET) permettraient de brosseur un meilleur portrait du lien existant entre MIG-6 et MIG-17 dans le remodelage du collagène IV.

pxn-2/Peroxidasine

L'équipe s'est également intéressée à savoir si non seulement les niveaux de collagène IV mais également son état de réticulation étaient importants pour supprimer les défauts de maintenance *sax-7*. Le collagène IV s'assemble en hétérotrimères et des liaisons covalentes et associations latérales permettent la formation un réseau stable (Timpl et al., 1981; Yurchenco and Ruben, 1987). De plus, des liaisons sulfilimines ont été identifiées entre les domaines C-terminaux des hétérotrimères de collagène IV et sont peut-être apparues lors de l'adaptation au stress mécanique chez les métazoaires pour conférer une stabilité accrue à la matrice extracellulaire, ce qui constitue un lien intéressant avec le projet vu l'impact qu'a le stress mécanique sur le développement de défauts de maintenance neuronale (Vanacore et al., 2009). Chez la drosophile, ces liaisons sulfilimines sont catalysées par la peroxidasine, une protéine des membranes basales étant co-exprimée avec la papiline par les hémocytes (Kramerova et al., 2000; Bhave et al., 2012). Cette fonction est possiblement occupée par PXN-2 chez le nématode, dont les rôles identifiés à ce jour concernent la morphogenèse embryonnaire et l'inhibition de la régénération axonale (Gotenstein et al., 2010; Gotenstein et al., 2018). Des résultats obtenus au laboratoire à la suite d'expériences d'ARNi contre *pxn-2* indiquent que ce gène serait requis de manière partielle pour la fonction de *mig-6* et *mig-17* dans la suppression des défauts de maintenance *sax-7*, ce qui appuie l'idée que PXN-2 serait impliquée dans l'organisation stable de la matrice extracellulaire et le maintien de son intégrité. Selon l'hypothèse qu'une augmentation de la stabilité de la matrice extracellulaire est à l'origine de la résilience des structures neuronales chez les doubles mutants *sax-7; mig-6*, il est possible de se questionner à savoir si une simple augmentation de la réticulation pourrait suffire à diminuer les défauts de maintenance neuronale, ou si l'augmentation des niveaux de collagène IV et la présence de structures fibrotiques sont tout de même nécessaires pour médier cet effet. À cet fin, la quantification des défauts neuronaux pourrait être conduite chez des mutants *sax-7* présentant une surexpression de *pxn-2*.

2.4.1.2 Interacteurs potentiels à investiguer

ost-1/SPARC

SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*) est une protéine intra- et extracellulaire pouvant lier le collagène IV avec son domaine C-terminal (Pottgiesser et al., 1994). Chez la drosophile, cette protéine agit comme chaperonne et co-localise avec le collagène IV au niveau de la voie sécrétrice des adipocytes (Duncan et al., 2020). C'est également le cas dans les cellules musculaires corporelles du nématode, où une co-localisation survient dans des vésicules au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (Morrissey et al., 2016). Les travaux de Morrissey *et al.* suggèrent également qu'au niveau extracellulaire, SPARC, encodée par le gène *ost-1*, assure le transport et régule l'incorporation des hétérotrimères de collagène IV aux membranes basales. En effet, les auteurs préconisent un modèle où SPARC solubiliserait le collagène IV extracellulaire étant donné qu'une surexpression de SPARC réduit la présence de collagène IV aux membranes basales et ce, sans affecter la voie de sécrétion intracellulaire. SPARC s'avérant être intimement liée à la régulation des niveaux de collagène IV aux membranes basales, il serait pertinent de tester si cette protéine affecte l'apparition de structures fibrotiques chez les mutants *mig-6*. Un fait intéressant à se rappeler est que les mutants *mig-6* semblent posséder davantage de collagène IV sous forme sphérique que le type sauvage. Notre groupe a démontré par des expériences de co-localisation par microscopie confocale que ces sphères étaient aussi situées dans l'espace intracellulaire des cellules musculaires de la paroi corporelle sécrétant le collagène IV. Une perte de fonction totale de SPARC chez la drosophile a entraîné un phénotype similaire, où les accumulations intracellulaires étaient plus grandes et de tailles plus variables (Duncan et al., 2020). Se pourrait-il que cela reflète une dérégulation dans le transport du collagène IV par SPARC ? D'une part, il serait intéressant de caractériser la distribution de SPARC chez les mutants *mig-6* au moyen d'un rapporteur traductionnel, puis d'effectuer des études de colocalisation avec le collagène IV. D'autre part, l'analyse d'une surexpression de SPARC sur la formation des structures fibrotiques et la suppression des défauts de maintenance neuronale pourrait informer sur son rôle dans le remodelage de la matrice extracellulaire chez les mutants *mig-6*.

gon-1/ADAMTS-9 -20

GON-1 fait partie d'un groupe de cinq ADAMTS présentes chez le nématode (Blelloch et al., 1999). À la suite d'une perte de fonction, cette protéine en grande partie sécrétée par les muscles

entraîne une accumulation de collagène IV autour de la cellule de pointe distale, ce qui affecte sa migration lors de la formation de la gonade (Hesselson et al., 2004; Kubota et al., 2012). De plus, il a été rapporté que GON-1 est nécessaire pour maintenir la morphologie synaptique à la jonction neuromusculaire en régulant les quantités de collagène IV à la membrane basale musculaire (Kurshan et al., 2014). À l'inverse, une déplétion post-développementale de *gon-1* n'engendre pas d'accumulation de collagène IV à la gonade et supprime même le phénotype fibreux du collagène IV présent à la membrane basale de la gonade des mutants *mig-6* décrit par Keeley *et al.* (Keeley et al., 2020). Chez ces mutants, une augmentation de GON-1 à la membrane basale de la gonade est également détectée, ce qui suggère que MIG-6, en plus de moduler la localisation de MIG-17, pourrait également réguler celle de GON-1, dont la présence à ce stade serait plutôt associée à la déposition de collagène IV. GON-1 ayant été associée à une accumulation et à une diminution de collagène IV à différentes membranes basales et semblant régulée par MIG-6, il se pourrait que cette ADAMTS soit impliquée dans l'apparition des structures fibrotiques au niveau du bulbe postérieur du pharynx.

2.4.2 Quelle importance pour la cassette papiline?

L'analyse de deux allèles différents, soit *qv33* et *k177*, ont permis de confirmer l'effet d'une perte de fonction de *mig-6* sur le remodelage de la matrice extracellulaire. De plus, l'usage de l'allèle *e1931* spécifique à *mig-6L* a indiqué que l'isoforme longue de MIG-6 n'est pas impliquée dans l'apparition des structures fibrotiques de collagène IV au niveau du bulbe postérieur du pharynx et que ces dernières seraient plutôt dues à une perte de fonction de l'isoforme courte de MIG-6. Cela est en accord avec les résultats témoignant du rôle spécifique de MIG-6C et non de MIG-6L dans la suppression des défauts neuronaux *sax-7* (Nadour et al., en préparation).

MIG-6 étant une protéine qualifiée d'ADAMTS-like en raison de la cassette papiline présente en N-terminal et du fait qu'elle peut inhiber une protéase *in vitro*, ce domaine conservé est-il suffisant pour réguler la distribution du collagène IV (Kramerova et al., 2000) ? Pour tester quelques domaines de MIG-6C sont importants pour sa fonction en maintenance neuronale, des expériences de sauvetage des phénotypes neuronaux et de remodelage de la matrice extracellulaire pourraient être menées en réintroduisant des versions recombinantes de MIG-6S: une séquence incomplète contenant uniquement la cassette papiline, et inversement, une autre contenant tous les domaines hormis la cassette papiline.

2.4.3 Conséquences d'une croissance en milieu liquide

2.4.3.1 Induction d'un stress mécanique important

Contrairement au déplacement par reptation sur gélose, le nématode adopte un comportement de nage en culture liquide. Cela représente une dépense énergétique plus importante qui corrèle avec l'augmentation de la fréquence d'ondulations corporelles (Korta et al., 2007; Fang-Yen et al., 2010; Laranjeiro et al., 2017).

Dans les présents travaux, l'observation de neurones sensoriels chez des vers cultivés en milieu liquide a révélé qu'un stress mécanique accru dû à la nage affecte les structures neuronales. Ce phénomène est-il dû à un changement dans le comportement d'alimentation, par exemple par une modification de la fréquence de pompage du pharynx, ou davantage au comportement de locomotion par la nage ? Des études ont rapporté que la fréquence de pompage de pharynx diminuait en culture liquide (Vidal-Gadea et al., 2012; Laranjeiro et al., 2019). Cependant, cette suppression du pompage du pharynx surviendrait plutôt en absence de nourriture ou immédiatement après un changement d'environnement, puisqu'un retour à une fréquence de pompage similaire à des vers cultivés sur milieu solide est présent quelques heures suivant une immersion en culture liquide (McCloskey et al., 2017).

En outre, les vers présentent différentes phases comportementales, soit une alternance entre des périodes actives et passives (McCloskey et al., 2017). Les mutants *mig-6* ayant démontré une meilleure préservation de la position neuronale en culture liquide, il pourrait être pertinent de mesurer la fréquence de pompage du pharynx et des mouvements corporels ainsi que la durée des périodes d'activité pour s'assurer qu'ils sont similaires au type sauvage. Cela permettrait de valider que l'effet protecteur perçu chez les mutants *mig-6* n'ait pas été causé par une simple diminution de la charge de stress mécanique. Pour renforcer cette idée, l'utilisation de mutants à locomotion réduite (*unc*) pourrait aider à valider si le phénotype observé dépend de la locomotion. Toutefois, le phénotype des mutants *mig-6* est affecté par les niveaux de collagène IV, étant donné que le déplacement postérieur des neurones réapparaît lorsque les niveaux de collagène IV sont réduits par ARNi, modulant l'état de la matrice extracellulaire. Ceci renforce l'idée que l'augmentation de la résilience des structures neuronales des mutants *mig-6* n'est pas due à un changement locomoteur, mais bien à une altération de la matrice extracellulaire. Une interprétation alternative

serait que les animaux en culture liquide se nourrissent moins qu'en culture solide, ce qui engendrait une restriction calorique affectant les mécanismes de maintenance neuronale.

2.4.3.2 Altération de l'architecture neuronale

Tel que discuté plus haut, la croissance en milieu liquide entraîne un déplacement postérieur des neurones sensoriels ASH et ASI chez le type sauvage. D'autres neurones sont peut-être affectés par ce type de stress mécanique. Récemment, un groupe de chercheurs a généré une souche nommée NeuroPAL permettant de visualiser et d'identifier tous les neurones du nématode (Yemini et al., 2021). Un logiciel d'identification semi-automatique a aussi été développé et permet de cartographier l'architecture du système nerveux en fonction de la position des noyaux des neurones. Plutôt que de ne quantifier que la position de deux paires de neurones sensoriels en condition de stress mécanique relativement au bulbe terminal du pharynx, la souche NeuroPAL pourrait permettre de quantifier la variation de position de tous les neurones à la fois. Il serait donc possible de déterminer si certains neurones sont davantage affectés que d'autres par un stress mécanique accru et si certains groupes de neurones conservent une organisation relative ou non, ce qui serait d'autant plus intéressant vu les effets spécifiques des facteurs de maintenance à certains axones des cordes nerveuses ou à certains corps cellulaires de ganglions neuronaux.

Par ailleurs, le déplacement neuronal perçu en culture liquide pourrait altérer l'emplacement de l'axone au sein de la commissure de l'amphide et possiblement de l'anneau nerveux, où la grande majorité des synapses se trouve (White et al., 1986). Cette désorganisation neuronale pourrait avoir des conséquences fonctionnelles, notamment si elle s'accompagne d'une perte de contact des partenaires synaptiques. ASH et ASI fonctionnant ensemble pour contrôler le comportement d'évitement du cuivre, des tests comportementaux pourraient être menés après une croissance en milieu liquide pour déterminer si l'aspect fonctionnel de ces neurones est également affecté, et si *mig-6* permet de préserver la fonction neuronale en plus de son architecture (Guo et al., 2015).

2.4.3.3 Impact sur la distribution du collagène IV

Les résultats relatifs à l'observation du collagène IV en condition de stress mécanique témoignent que certains composants de la matrice extracellulaire pourraient être régulés dans ces conditions. En effet, la distribution du collagène IV entre les quadrants musculaires de la tête est caractéristique de la distribution en fibres de type élastiques de HIM-4/Hémicentine et de FBL-

1/Fibuline chez *C. elegans*, et n'est normalement pas observée sur culture solide (Vogel and Hedgecock, 2001; Muriel et al., 2005; Keeley et al., 2020). Ce faisant, il pourrait être intéressant d'utiliser les rapporteurs traductionnels développés par Keeley *et al.* pour caractériser la localisation des composants des membranes basales dans une condition de stress mécanique, en portant une attention particulière à celle de MIG-6, FBL-1 et HIM-4.

Plusieurs études indiquent que d'importantes variations dans l'expression génique surviennent en culture liquide. D'abord, similairement à ce qui a été rapporté ici, les animaux cultivés en milieu liquide sont plus longs que ceux ayant grandi sur milieu solide et cette modification morphologique est transmise à leur progéniture, même lorsque cette dernière a été cultivée sur milieu solide, ce qui pourrait être dû à des modifications épigénétiques (Doh et al., 2016; Lev et al., 2019). Par ailleurs, une analyse transcriptomique soutient ces résultats : il a été estimé que d'importants changements d'expression génique survenaient chez les vers cultivés en milieu liquide, et qu'entre 8-34% de ces changements étaient transmis à leur progéniture (Celen et al., 2018). Cette étude indique également que l'expression génique varie en fonction du génotype étudié. Performer une analyse transcriptomique chez les mutants *mig-6* en culture liquide pourrait permettre d'identifier les changements d'expression génique impliqués dans le maintien de l'architecture neuronale. L'immobilisation des nématodes par des moyens pharmacologiques (p.ex. levamisole) ou génétiques (p.ex. mutants *unc* ayant des troubles locomoteurs) pourrait aussi confirmer que le déplacement neuronal observé dépend du stress mécanique et non de l'altération d'expression génique en culture liquide.

2.4.4 Remodelage de la matrice extracellulaire : plasticité et élasticité

Un résultat marquant de cette étude est l'apparition des structures fibrotiques de collagène IV ainsi que l'augmentation de ce composant au niveau de la tête des mutants *mig-6*, ce qui dénote un état altéré de la matrice extracellulaire. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse initiale que MIG-6, en raison de ses rôles connus sur la morphogenèse et la régulation du collagène IV, agirait sur le remodelage de l'environnement péri-neuronal pour antagoniser la perte d'adhésion des mutants *sax-7*. Ainsi, le modèle simplifié présenté dans l'introduction mettait de l'avant un équilibre entre des facteurs d'adhésion et de flexibilité pour expliquer la maintenance de l'architecture neuronale en conditions normales. Pour tester le modèle, la prédiction de l'impact d'une perte de fonction de *mig-6* sur la flexibilité de l'environnement extracellulaire et

subséquentement sur la maintenance des structures neuronales a été mis à l'épreuve lors des expériences de stress mécanique. Ces expériences m'ont poussé à aborder le phénotype de remodelage de la matrice extracellulaire détecté chez les mutants *mig-6* sous un angle de biomécanique et à revisiter le modèle intégré.

Le collagène IV permet de maintenir l'intégrité structurelle des membranes basales, notamment grâce à son assemblage en réseau par des liaisons covalentes qui confèrent rigidité et stabilité aux membranes basales (Pöschl et al., 2004; Khalilgharibi and Mao, 2021). En fait, en plus d'employer les termes « rigidité » et « flexibilité » pour caractériser l'état de la matrice extracellulaire, il serait pertinent d'utiliser les concepts de « viscoélasticité » et de « viscoplasticité » pour en décrire les propriétés mécaniques (Chaudhuri et al., 2020; Khalilgharibi and Mao, 2021). Voici quelques définitions traduites selon Khalilgharibi et Mao, 2021 :

- L'élasticité représente la capacité d'un matériau à se déformer sous l'effet d'un stress mécanique externe, puis à retrouver sa forme initiale à la suite de son retrait, et ce, indépendamment de la durée d'application du stress.
- La plasticité représente la capacité d'un matériau à se déformer de manière irréversible et permanente lorsqu'il est exposé à un stress mécanique externe.
- La viscosité représente la capacité d'un fluide à résister contre sa déformation face à un stress mécanique externe.
- La viscoélasticité est la réponse mécanique d'un matériau qui présente à la fois des caractéristiques élastiques et visqueuses.
- La viscoplasticité est la réponse mécanique d'un matériau qui se déforme de manière irréversible en fonction de la durée d'un stress mécanique externe.

Chez l'embryon de *C. elegans*, les neurones sensoriels de l'amphide, dont ASH et ASI, allongent leur dendrite par extension rétrograde, simultanément à la migration postérieure du corps cellulaire (Heiman and Shaham, 2009; Fan et al., 2019). La matrice extracellulaire devrait alors être assez plastique durant le développement embryonnaire pour permettre la migration neuronale, mais ensuite suffisamment élastique durant la vie post-natale larvaire et adulte pour en préserver la position à long terme contre les stress mécaniques.

D'un côté, le déplacement neuronal observé chez le type sauvage adulte en culture liquide indique qu'un phénomène de plasticité de la matrice extracellulaire survient dans ce contexte de stress mécanique soutenu dans le temps. En suivant cette logique, la perte de fonction de *mig-6* induirait alors une augmentation de la viscoélasticité ou une diminution de la viscoplasticité de la

matrice extracellulaire, puisque malgré les forces mécaniques induites par la nage, les neurones sont mieux préservés à leur position initiale que le type sauvage, indiquant que la matrice extracellulaire n'a pas été déformée de manière permanente. Les résultats révélant que le collagène IV est altéré chez les mutants *mig-6* sont consistants avec cette hypothèse. En effet, une augmentation de la quantité et de la réticulation du collagène IV est associée à une rigidité plus importante de la membrane basale (Bhave et al., 2017; Khalilgharibi and Mao, 2021). Le phénomène plastique de déformation de la matrice extracellulaire nécessitant la dissipation de l'énergie par la rupture de liaisons non-covalentes est justement diminué lorsque la matrice est plus rigide (Nam et al., 2016).

La rigidité de la matrice extracellulaire peut aussi influencer l'adhésion entre les cellules et leur milieu. Ce mécanisme a été extensivement étudié pour comprendre l'impact de la rigidité tumorale sur l'invasion cellulaire et l'acquisition de propriétés métastatiques *in vitro* (Gkretsi and Stylianopoulos, 2018). En bref, des changements de l'état de l'environnement cellulaire sont perçus par les intégrines, des récepteurs transmembranaires interagissant à la fois avec le milieu intra- et extracellulaire, et une augmentation de la rigidité de la matrice extracellulaire a été associée à une adhésion cellulaire-matrice accrue (Paszek et al., 2005; Gkretsi and Stylianopoulos, 2018). Étudier la régulation des intégrines chez les mutants *mig-6* serait alors une autre avenue intéressante.

Concernant la présence de structures fibrotiques, si ces structures influencent les propriétés viscoélastiques de la matrice chez les mutants *mig-6* est incertain, mais il se pourrait qu'elles agissent pour la renforcer dans une direction spécifique (anisotropie), similairement au rôle des fibrilles de collagène IV dans l'élongation de l'œuf durant l'ovogenèse de la drosophile (Haigo and Bilder, 2011). Par ailleurs, il se pourrait simplement que ces structures fibrotiques ne soient qu'un sous-produit macroscopique et détectable de l'état sous-jacent de la matrice extracellulaire, sans pour autant conférer des propriétés spécifiques à la matrice extracellulaire, ni avoir un lien causal avec le maintien de la position des neurones.

D'un autre côté, la perte de fonction de la molécule d'adhésion cellulaire SAX-7 entraîne la désorganisation relative des neurones par rapport au neuropile dépendante de la locomotion, constituant un autre exemple d'événement plastique possiblement engendré par un manque d'adhésion entre les cellules et leur milieu. Dans ce contexte, une présumée augmentation de la viscoélasticité (ou diminution de la viscoplasticité) de l'environnement périneuronal par une perte

de fonction de *mig-6* viendrait compenser le manque d'adhésion pour rétablir l'organisation neuronale.

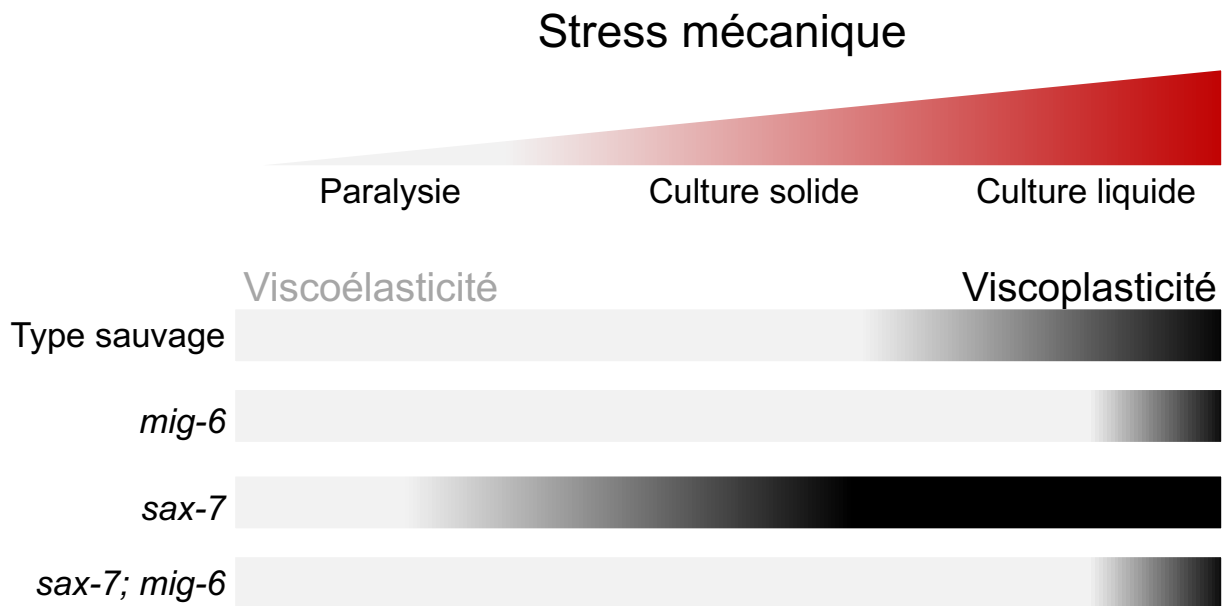


Figure 18. – Résumé du modèle intégrant des concepts de biomécanique. Cette figure tente de concilier les concepts de viscoélasticité (gris) et viscoplasticité (noir) abordés pour expliquer les phénotypes neuronaux observés en fonction du génotype et du stress mécanique (rouge) auquel les vers ont dû faire face tout au long de leur vie. En réponse à un stress mécanique très faible dû à une paralysie, les neurones restent à leur position initiale y compris chez les simples mutants *sax-7*. En culture solide, l'environnement neuronal est assez viscoélastique pour opposer le stress mécanique induit par la locomotion chez le type sauvage et les mutants *mig-6*. Cependant, chez les simples mutants *sax-7*, la reptation ou la nage constituent des stress mécaniques suffisants pour induire des défauts de maintenance neuronale. Si le milieu est viscoplastique à proprement parlé chez ces mutants ou si les neurones interprètent différemment les signaux de l'état de la matrice extracellulaire n'est pas connu, mais le déplacement des neurones antérieurement à l'anneau nerveux suggère tout de même un phénomène de plasticité. Une perte de fonction de *mig-6* mène quant à elle à un remodelage de la matrice extracellulaire qui pourrait augmenter la viscoélasticité ou diminuer la viscoplasticité du milieu face à un stress mécanique accru pour prévenir le déplacement neuronal postérieur observé chez le type sauvage. Ce changement de la réponse viscoélastique permettrait également de prévenir l'apparition des défauts de maintenance *sax-7* chez les doubles mutants *sax-7; mig-6* en cultures solide et liquide.

En revanche, la diminution du déplacement neuronal postérieur en condition de stress mécanique chez les mutants *sax-7* comparativement au type sauvage représente un résultat très surprenant. Il aurait été attendu que les cellules adhérant moins bien entre elles et à leur milieu soient autant ou davantage affectées par la nage que le type sauvage. Une hypothèse possible pour expliquer ce résultat serait la nécessité de la tension au niveau du dendrite pour permettre son

extension et subséquemment son déplacement postérieur du corps cellulaire. En effet, aucun défaut d'attachement des dendrites au nez n'a été détecté chez les animaux ayant présenté un déplacement postérieur des neurones, indiquant que les dendrites se sont allongées pour permettre le déplacement neuronal, ce qui rappelle le concept d'extension rétrograde mentionné plus haut. De surcroît, un grand nombre d'études appuient l'hypothèse que la tension contribue à l'élaboration de neurites ou prolongements cytoplasmiques gliaux (Van Essen, 2020). La tension entre le corps cellulaire et l'extrémité de la dendrite pourrait donc participer à la maintenance de la position du corps cellulaire et SAX-7 pourrait entretenir cette tension en ancrant le neurone à son milieu. Il est possible qu'un tel manque de tension soit présent chez les mutants *sax-7* vu la morphologie dendritique parfois courbée qui rappelle une corde détendue (observations anecdotiques). Pour tester cette possibilité, il serait intéressant d'étudier la position des neurones RIA en condition de stress mécanique, car ceux-ci sont désorganisés chez les mutants *sax-7* sur culture solide, mais étant unipolaires, ils ne possèdent pas de dendrites ancrées au nez du ver (Sasakura et al., 2005).

Tout ce qui a été proposé ici reste toutefois à être démontré. Pour ce faire, il serait nécessaire de directement mesurer l'état de la matrice extracellulaire, mais cela reste compliqué à effectuer *in vivo*. Jusqu'à présent, la technique la plus répandue pour mesurer la rigidité d'un tissu est la microscopie par force atomique (Jorba et al., 2017). Cependant, la mesure est prise perpendiculairement à l'échantillon et nécessite un contact direct avec ce dernier, rendant sa pratique impossible dans les tissus profonds chez *C. elegans*. Une technique ayant le potentiel de contourner cette limitation est la microscopie de Brillouin, où la lumière est utilisée pour mesurer les propriétés viscoélastiques d'un matériau par l'analyse de sa diffusion à travers celui-ci (Prevedel et al., 2019). Cette technique a notamment permis de caractériser les propriétés mécaniques de tumeurs *in vitro* et de la matrice extracellulaire entourant la notochorde du poisson zèbre *in vivo* (Bevilacqua et al., 2019; Margueritat et al., 2019). Elle pourrait grandement aider à répondre aux questions soulevées précédemment.

CHAPITRE 3 – Exploration des cellules gliales dans un contexte de maintenance

3.1 Introduction

Le second volet exploratoire de ces travaux de maîtrise concerne l'investigation d'un autre facteur extrinsèque ayant le potentiel d'influencer la protection à long terme de l'architecture du système nerveux : les cellules gliales. Ces dernières comportent des fonctions diverses au sein du système nerveux, mais leur implication dans la maintenance de l'organisation neuronale n'a pas encore été approfondie. De ce fait, deux types de cellules gliales à proximité des structures neuronales défaillantes chez les mutants *sax-7*, soit les neurones des ganglions de la tête en relation avec la position de l'anneau nerveux, ont été ciblés afin d'entamer leur étude dans un contexte de maintenance du système nerveux : les GLR (*Glial-Like cells in the nerve Ring*) et les CEPsh (*CEPhalic Sheath*) (Figure 19).

3.1.2 Les GLR : des cellules gliales tapissant l'intérieur du neuropile

Les six GLR (Figure 19A, B) sont les seules cellules gliales qui dérivent du mésoderme. Elles sont situées à l'intérieur de l'anneau nerveux et contactent à la fois les muscles de la tête et les motoneurones RME au moyen de jonctions gap (White et al., 1986). Les GLR sont notamment impliquées dans la spécification axonale de ces motoneurones et pourraient être impliquées dans le guidage des bras musculaires lors du développement et à la régulation de l'activité des jonctions neuromusculaires (White et al., 1986; Meng et al., 2016; Singhvi and Shaham, 2019). Fait intéressant, ces cellules sécrètent le collagène IV et MIG-6, ce qui pourrait éventuellement mener à l'étude d'une interaction entre les neurones, la glie et la matrice extracellulaire (Graham et al., 1997; Norman and Moerman, 2000; Kawano et al., 2009). Le choix d'examiner les GLR dans un contexte de maintenance relève non seulement de leur localisation près des ganglions affectés chez les mutants de maintenance, mais aussi parce l'ablation des trois cellules mères donnant naissance aux GLR mène à la défasciculation et au déplacement antérieur de l'anneau nerveux après sa formation initialement intacte (Shah et al., 2017). Cette indication que les GLR seraient requises pour la maintenance du neuropile reste toutefois à approfondir à un stade post-développemental plus tardif.

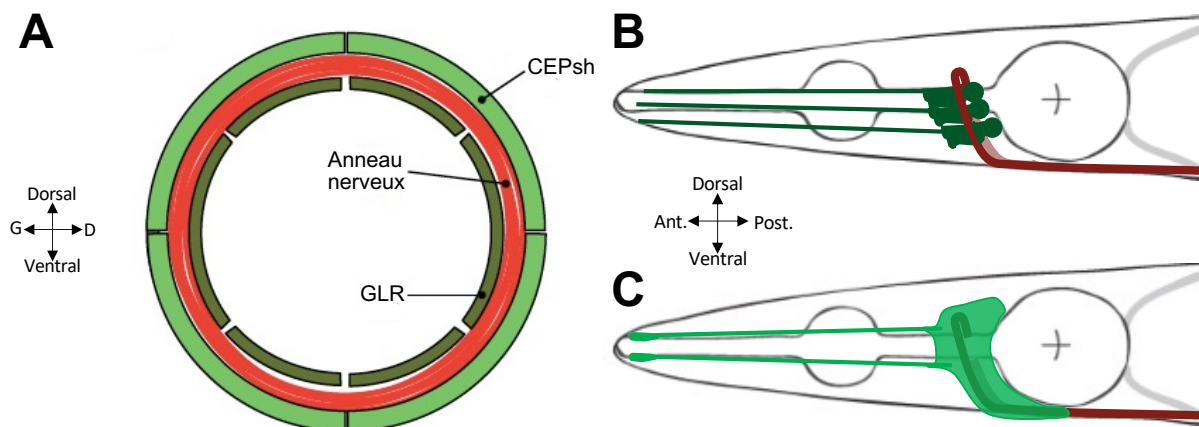


Figure 19. – Schématisation des cellules gliales à l'étude. (A) Les quatre CEPsh (vert pâle) recouvrent l'extérieur de l'anneau nerveux (rouge) tandis que les six GLR (vert foncé) en recouvrent l'intérieur. (B) Trois GLR sont représentées en vue latérale. Les corps cellulaires sont situés juste postérieurement au neuropile et étendent des prolongements antérieurement. (C) Deux CEPsh sont représentées en vue latérale. Les CEPsh se chevauchent et étendent des prolongements cytoplasmiques antérieurement. Ant., antérieur; D, droite; G, Gauche; Post., postérieur. Image A adaptée de Shaham (2015).

3.1.3 Les CEPsh : des cellules gliales recouvrant le neuropile

Le deuxième type de cellules gliales à l'étude sont les CEPsh (Figure 19A, C), soit quatre cellules qui se chevauchent pour recouvrir l'entièreté de l'anneau nerveux, une propriété conservée des astrocytes du système nerveux centrale des mammifères (Singhvi and Shaham, 2019). D'autres éléments indiquent des similitudes entre les CEPsh et les astrocytes. Par exemple, ces cellules gliales possèdent des prolongements cytoplasmiques pouvant rejoindre des synapses au sein de l'anneau nerveux, et même former une synapse tripartite classique avec les neurones ALA et AVE (Katz et al., 2018; Singhvi and Shaham, 2019). De plus, elles expriment des gènes similaires aux astrocytes, tels que le transporteur de glutamate *glt-1*/EAAT2, la protéine du cytosquelette *ifa-4*/GFAP et la protéine de guidage axonal *fmi-1*/CELSR1 (Katz et al., 2019). Des fonctions neurodéveloppementales et régulatrices de la fonction neuronale semblables aux astrocytes leur ont aussi été attribuées, signifiant que l'étude des CEPsh pourrait mener à la découverte de mécanismes conservés chez les cellules gliales humaines (Yoshimura et al., 2008; Oikonomou and Shaham, 2011; Rapti et al., 2017; Katz et al., 2018; Katz et al., 2019; Singhvi and Shaham, 2019). Les CEPsh étant cruciales pour la formation de l'anneau nerveux, le sont-elles également pour sa maintenance à long terme ?

3.1.4 Objectifs

3.1.4.1 Générer les outils nécessaires à l'étude des cellules gliales en contexte de maintenance du système nerveux

L'étude des cellules gliales étant encore un champ de recherche émergent chez *C. elegans*, peu d'outils génétiques sont disponibles afin de pouvoir disséquer leurs fonctions. Des techniques de biologie moléculaire seront donc employées pour générer tous les outils nécessaires à l'atteinte des objectifs suivants.

3.1.4.2 Explorer l'impact d'une perturbation post-développementale des cellules gliales

Un premier pas vers la compréhension des rôles des cellules gliales dans la maintenance du système nerveux serait l'identification d'un phénotype neuronal après en avoir altéré les fonctions, et ce, une fois le système nerveux complètement formé. L'établissement d'une approche de perturbation cellulaire par optogénétique au sein du laboratoire, permettant un contrôle spatiotemporel précis, permettrait d'atteindre cet objectif.

3.1.4.3 Caractériser la morphologie gliale chez le type sauvage ainsi que chez les mutants de maintenance *sax-7*

Jusqu'à présent, la maintenance de l'architecture du système nerveux n'a été étudiée qu'en adoptant un point de vue neurocentrique. Qu'advient-il des cellules gliales chez les mutants de maintenance *sax-7* ? La désorganisation des ganglions de la tête s'étend-elle aux cellules gliales ? Si oui, quel lien existe-t-il entre cette possible altération gliale et les défauts de maintenance neuronale ? Pour répondre à ces questions, l'observation des cellules gliales chez le type sauvage et les mutants *sax-7* sera effectuée, sachant que SAX-7 est exprimée dans les GLR et les CEPsh durant la période post-natale (Hutter et al., 2009).

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Maintien des souches

Les vers ont été cultivés dans un incubateur à 20 °C conformément à la procédure standard, soit sur des boîtes de Pétri contenant du *Nematode Growth Medium* (NGM)ensemencé de *E. coli* OP50 (Brenner, 1974). La souche N2 Bristol constitue le type sauvage de cette étude. L'allèle *sax-7(qv30)* utilisé se trouve au tableau 1 du chapitre 2 et les souches utilisées, au tableau 3.

Tableau 3. – Liste des souches utilisées pour l'axe II.

Souche	Génotype	Transgène	Référence
N2			Brenner (1974)
VPR156	<i>vprIs156</i>	<i>Phlh-17C::monomericDsRed</i>	Stout et al. (2013)
VQ51	<i>oyIs14 V</i>	<i>Psra-6::gfp; lin-15(+)</i>	Sarafi-Reinach et al. (2001)
VQ1780	<i>qvIs10 IV</i>	<i>Pnep-2C::myr::wrmScarlet</i>	Cette étude
VQ1781	<i>qvIs11</i>	<i>Pnep-2C::myr::wrmScarlet</i>	Cette étude
VQ1782	<i>qvIs12</i>	<i>Pnep-2C::myr::wrmScarlet</i>	Cette étude
VQ1783	<i>qvIs13 IV</i>	<i>Pnep-2C::myr::wrmScarlet</i>	Cette étude
VQ1796	<i>qvIs10 IV, 7OC</i>	<i>Pnep-2C::myr::wrmScarlet</i>	Cette étude
VQ1819	<i>vprIs156; oyIs14 V</i>		Cette étude
Maintenance gliale			
VQ1757	<i>sax-7(qv30) IV; qvEx495</i>	<i>Phlh-17C::myr::gfp</i>	Cette étude
VQ1816	<i>sax-7(qv30) IV; qvEx567</i>	<i>Pnep-2C::myr::wrmScarlet</i>	Cette étude
Visualisation des GLR			
VQ1761	<i>+</i> ; <i>qvEx565</i>	<i>pCB464 50 ng/μl; cc::gfp 50 ng/μl; pBSK+ 100 ng/μl Lignée 1</i>	Cette étude
VQ1762	<i>+</i> ; <i>qvEx566</i>	<i>pCB464 50 ng/μl; cc::gfp 50 ng/μl; pBSK+ 100 ng/μl Lignée 2</i>	Cette étude
VQ1763	<i>+</i> ; <i>qvEx567</i>	<i>pCB464 50 ng/μl; cc::gfp 50 ng/μl; pBSK+ 100 ng/μl Lignée 3</i>	Cette étude
Visualisation des CEPsh			
VQ1607	<i>+</i> ; <i>qvEx495</i>	<i>Phlh-17C::myr::gfp</i>	Cette étude

Perturbation des GLR			
VQ1770	+, <i>qvEx570</i>	<i>pCB465</i> à 75 ng/μl; <i>cc::gfp</i> à 50 ng/μl; <i>pBSK+</i> à 75 ng/μl Lignée 1	Cette étude
VQ1790	+, <i>qvEx580</i>	<i>pCB465</i> à 100 ng/μl; <i>Pttx-3::mCherry</i> à 50 ng/μl; <i>pBSK+</i> à 50 ng/μl Lignée 1	Cette étude
VQ1791	+, <i>qvEx581</i>	<i>pCB465</i> à 100 ng/μl; <i>Pttx-3::mCherry</i> à 50 ng/μl; <i>pBSK+</i> à 50 ng/μl Lignée 2	Cette étude
VQ1792	+, <i>qvEx582</i>	<i>pCB465</i> à 100 ng/μl; <i>Pttx-3::mCherry</i> à 50 ng/μl; <i>pBSK+</i> à 50 ng/μl Lignée 3	Cette étude
VQ1793	+, <i>qvEx583</i>	<i>pCB465</i> à 100 ng/μl; <i>Pttx-3::mCherry</i> à 50 ng/μl; <i>pBSK+</i> à 50 ng/μl Lignée 4	Cette étude
VQ1794	+, <i>qvEx584</i>	<i>pCB465</i> à 100 ng/μl; <i>Pttx-3::mCherry</i> à 50 ng/μl; <i>pBSK+</i> à 50 ng/μl Lignée 5	Cette étude
VQ1797	<i>qvIs10 IV</i> ; <i>qvEx580</i>	<i>Pnep-2C::PH::miniSOG(Q103L)</i>	Cette étude
VQ1798	<i>qvIs10 IV</i> ; <i>oyIs14 V</i> ; <i>qvEx580</i>	<i>Pnep-2C::PH::miniSOG(Q103L)</i>	Cette étude
Perturbation des CEPsh			
VQ1768	<i>vprIs156</i> ; <i>qvEx568</i>	<i>pCB468</i> 50 ng/μl; <i>pCB469</i> à 50 ng/μl; <i>cc::gfp</i> à 50 ng/μl; <i>pBSK+</i> à 50 ng/μl Lignée 1	Cette étude
VQ1769	<i>vprIs156</i> ; <i>qvEx569</i>	<i>pCB468</i> 50 ng/μl; <i>pCB469</i> à 50 ng/μl; <i>cc::gfp</i> à 50 ng/μl; <i>pBSK+</i> à 50 ng/μl Lignée 2	Cette étude
VQ1784	<i>vprIs156</i> ; <i>qvEx574</i>	<i>pCB468</i> à 100 ng/μl; <i>cc::gfp</i> à 50 ng/μl; <i>pBSK+</i> à 50 ng/μl Lignée 1	Cette étude
VQ1785	<i>vprIs156</i> ; <i>qvEx575</i>	<i>pCB468</i> à 100 ng/μl; <i>cc::gfp</i> à 50 ng/μl; <i>pBSK+</i> à 50 ng/μl Lignée 2	Cette étude
VQ1786	<i>vprIs156</i> ; <i>qvEx576</i>	<i>pCB468</i> à 100 ng/μl; <i>cc::gfp</i> à 50 ng/μl; <i>pBSK+</i> à 50 ng/μl Lignée 3	Cette étude
VQ1809	<i>vprIs156</i> ; <i>qvEx586</i>	<i>pCB468</i> 100 ng/μl; <i>Pttx-3::mCherry</i> à 50 ng/μl; <i>pBSK+</i> à 50 ng/μl Lignée 1	Cette étude
VQ1810	<i>vprIs156</i> ; <i>qvEx587</i>	<i>pCB468</i> 100 ng/μl; <i>Pttx-3::mCherry</i> à 50 ng/μl; <i>pBSK+</i> à 50 ng/μl Lignée 2	Cette étude
VQ1811	<i>vprIs156</i> ; <i>qvEx588</i>	<i>pCB468</i> 100 ng/μl; <i>Pttx-3::mCherry</i> à 50 ng/μl; <i>pBSK+</i> à 50 ng/μl Lignée 3	Cette étude
VQ1819	<i>vprIs156</i> ; <i>oyIs14 V</i>		Cette étude
VQ1820	<i>vprIs156</i> ; <i>oyIs14 V</i> ; <i>qvEx586</i>	<i>Phlh-17L::PH::miniSOG(Q103L)</i>	Cette étude

OC, *out-cross*.

3.2.1 Clonages

Les plasmides et amorces utilisés pour les clonages sont listés dans les tableaux 4 et 5. Tous les plasmides ont été confirmés par PCR ou digestions de restrictions. Dans le cas où des PCR à haute-fidélité étaient effectuées pour amplifier l'insert, le plasmide généré a été confirmé par séquençage au Centre d'expertise et de services Génome Québec.

Tableau 4. – Liste des amorces utilisées pour l'axe II.

Gène / plasmide	Amorce	Orientation	Séquence (5' → 3')	Taille du fragment (pb)
Génotypage				
<i>sax-7(qv30)</i>	Spécifiques au type sauvage			592
	oCB212	Sens	gaaatacacacaaatcacgagtgc	
	oCB723	Anti-sens	tagttgattaaaaatgttcaagattg	
	Spécifiques au mutant			326
	oCB747	Sens	tctctcaaaattcttcgcaagc	
	oCB1025	Anti-sens	cgggaagaaatgaaacagga	
Clonages				
pCB462	Amplification de <i>Pnep-2C</i> avec sites de restriction SphI & AgeI			1509
	oCB2069	Sens	catgatgcatgcaattcgcccttgcaaagtgg	
	oCB2070	Anti-sens	catgataccggctctcatatcgggaggcgtcc	
	Séquençage			
	oCB2040	Sens	tgccaggtgtcccattacg	
	oCB2041	Anti-sens	acgtggtgtcaggctgtc	
oCB2042	Sens	ttccgaacaactgttc		
pCB465	Amplification de <i>PH::miniSOG(Q103L)</i> avec sites de restriction AgeI & NheI			754
	oCB2071	Sens	catgataccggctcgatccgatctatgcacg	
	oCB2072	Anti-sens	catgatgctagctcatccatccagcagcactcc	
	Séquençage			
	oCB570	Anti-sens	ttagaggtgacttaaaagaagc	
	oCB2042	Sens	ttccgaacaactgttc	
oCB2043	Anti-sens	ttgcagtctctctgtagc		
pCB468 & pCB469	PCR nichée - <i>Phlh-17L</i>			2937
	oCB2101	Sens	acacactggcttcacacc	
	oCB2102	Anti-sens	ggaaagtcgaacaccagg	
	Amplification de <i>Phlh-17L</i> avec sites de restriction SphI & XmaI			2489
	oCB2103	Sens	catgatgcatgcacggagttgaggccaaaatcc	
	oCB2104	Anti-sens	catgatggtaccaggaatgacaggaaagagacaatagg	
	Amplification de <i>Phlh-17L</i> avec sites de restriction SphI & KpnI			2489
	oCB2103	Sens	catgatgcatgcacggagttgaggccaaaatcc	
	oCB2105	Anti-sens	catgatcccgggaggaatgacaggaaagagacaatagg	
	Séquençage			
oCB1833	Sens	ctcacaacgatggatacg		
oCB1849	Anti-sens	ctgaaaattccgcacttg		
oCB1850	Sens	tggaatagcaacccttgc		
oCB1851	Anti-sens	tgactcgtctggagaaag		
oCB1852	Sens	ttctccgtgcccttcc		

pb, paire de base

Tableau 5. – Liste des plasmides utilisés pour l'axe II.

Plasmide	Description	Référence
pCB463	<i>myr::wrmScarlet(1-342 pb)</i>	ITD (<i>Integrated DNA Technologies</i>)
pCZGY2849	<i>PH::miniSOG(Q103L)</i>	Xu et Chisholm (2016); Gracieuseté du Dr Michael Francis (Réception sur papier Whatman)
pJE19	<i>Pglt-3::wrmScarlet</i>	El Mouridi et al. (2017); Gracieuseté du Dr Dan Shaye (Réception sur papier Whatman)
pNYL273	<i>Pnep-2C</i>	Meng et al. (2016); Gracieuseté du Dr Dong Yan (Réception sur papier Whatman)
Visualisation des GLR		
pCB462	<i>Pnep-2C::wrmScarlet</i>	Cette étude
pCB464	<i>Pnep-2C::myr::wrmScarlet</i>	Cette étude
pCB470	<i>Pnep-2C::myr::gfp</i>	Cette étude
Visualisation des CEPsh		
pGR125	<i>Phlh-17C::myr::gfp</i>	Yoshimura et al. (2008)
pCB469	<i>Phlh-17L::myr::gfp</i>	Cette étude
Perturbation des GLR		
pCB465	<i>Pnep-2C::PH::miniSOG(Q103L)</i>	Cette étude
Perturbation des CEPsh		
pCB468	<i>Phlh-17L::PH::miniSOG(Q103L)</i>	Cette étude

Visualisation des GLR

Pnep-2C::wrmScarlet (pCB462) : *Pnep-2C* a été amplifié avec les amorces oCB2069 et oCB2070 à partir de pNYL273 digéré avec *AgeI* et *SphI* puis lié dans le vecteur pJE19 digéré avec *AgeI* et *SphI*.

Pnep-2C::myr::wrmScarlet (pCB464): pCB463 a été digéré avec *AgeI* et *XhoI* puis lié dans le vecteur pCB462 digéré avec *AgeI* et *XhoI*.

Pnep-2C::myr::gfp (pCB470): pCB462 a été digéré avec *SphI* et *AgeI* puis lié dans le vecteur pGR125 digéré avec *SphI* et *AgeI*.

Visualisation des CEPsh

Phlh-17L::myr::gfp (pCB469): *Phlh-17L* a été amplifié par PCR nichée avec les amorces oCB2101, oCB2102, oCB2103 et oCB2105 sur ADN génomique, digéré avec *SphI* et *KpnI* puis lié dans le vecteur pGR125 digéré avec *SphI* et *KpnI*.

Perturbation des GLR

Pnep-2C::PH::miniSOG(Q103L) (pCB465): *PH::miniSOG(Q103L)* a été amplifié avec les amorces oCB2071 et oCB2072 à partir de pCZGY2849, digéré avec *AgeI* et *NheI* puis lié dans le vecteur pCB462 digéré avec *AgeI* et *NheI*.

Perturbation des CEPsh

Phlh-17L::PH::miniSOG(Q103L) (pCB468): *Phlh-17L* a été amplifié par PCR nichée avec les amorces oCB2101, oCB2102, oCB2103 et oCB2104 sur ADN génomique, digéré avec *SphI* et *XmaI* puis lié dans le vecteur pCB465 digéré avec *SphI* et *AgeI*.

3.2.2 Micro-injections et génération de lignées transgéniques

Des techniques de micro-injection standard ont été employées pour générer des animaux transgéniques (Mello and Fire, 1995). Les plasmides ont été injectés à une concentration allant de 50 à 100 ng/μL avec un marqueur de co-injection [*Punc-122::gfp* (cœlomocytes verts) ou *Pttx-3::mCherry* (neurones AIY rouges)] à une concentration de 50 ng/μL. Le plasmide pBSK+ a été utilisé pour compléter la concentration finale d'ADN à 200 ng/μL. Les concentrations utilisées sont indiquées au tableau 3.

3.2.3 Intégration de plasmides extra-chromosomaux

Dans le but d'éviter l'expression mosaïque du rapporteur *Pnep-2C::myr::wrmScarlet* présente dans les lignées transgéniques, une intégration aléatoire au génome a été performée. Brièvement, quatre plaques contenant 25 vers au stade L4 ont été irradiés sous des rayons UV à 3000 joules au moyen d'un *cross-linker* (Stratalink), induisant des bris d'ADN et l'incorporation des plasmides extra-chromosomaux au génome lors de la réparation de l'ADN (Mariol et al., 2013). Ces vers ont ensuite été redistribués sur vingt nouvelles plaques. Deux semaines plus tard, 200 vers ont été isolés à partir de la moitié des plaques irradiées, l'autre étant préservée en cas d'échec de l'intégration. Quelques jours plus tard, les 200 plaques ont été triées pour repérer celles dont la progéniture présentait une pénétrance de 100 % pour le marqueur étudié. Enfin, les candidats ont été observés pendant cinq générations pour confirmer le succès de l'intégration, puis sept *out-cross* avec la souche de type sauvage N2 ont été réalisés pour nettoyer le fond génétique de mutations indésirables.

3.2.4 Microscopie

Les souches ont été maintenues à 20 °C et bien nourries pendant au moins trois générations avant leur observation. L'âge adulte des vers est déterminé comme suit : l'âge « jour 1 » correspond à 24 heures post-stade larvaire L4, l'âge « jour 2 » correspond à 48 heures post-stade L4, etc.

Les vers ont été immobilisés avec de l'azide de sodium (75 mM) sur une mince couche d'agarose 5%, puis recouverts d'une lamelle. L'observation des vers s'est faite au microscope à fluorescence *Imager M2* muni d'une caméra *AxioCam* permettant la capture d'images traitées par le logiciel *AxioVision*. Le traitement post-expérimental des images a été effectué à l'aide du logiciel *ImageJ* et les déconvolutions à l'aide de *AxioQuant 3X*.

3.2.5 Analyse morphologique des cellules gliales

Caractérisation des GLR

Les vers ont été observés en vue latérale. Les six GLR ont été visualisés à 40X avec le rapporteur *qvIs10* ou *qvEx567* (*Pnep-2C::myr::wrmScarlet*). La longueur des prolongements cytoplasmiques en feuille a été mesurée avec le logiciel *AxioVision* lors de la prise d'images (Figure 20). Un déplacement postérieur était noté lorsque le corps cellulaire touchait le bulbe terminal du pharynx.

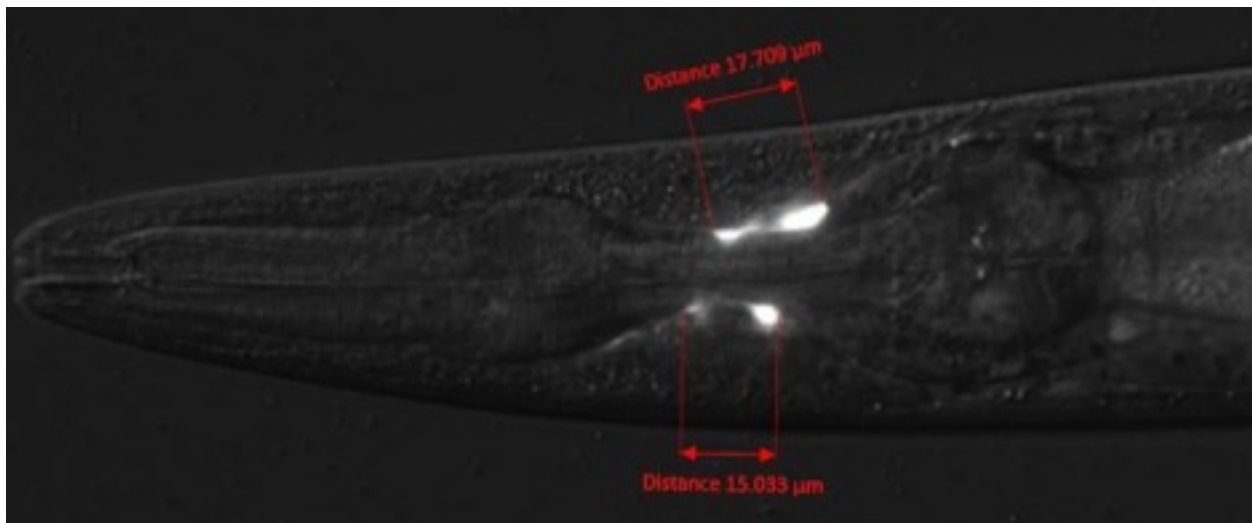


Figure 20. – Exemple de mesures des prolongements cytoplasmiques en feuille des GLR chez le type sauvage.

Caractérisation des CEPsh

Les vers ont été observés en vue latérale. Les quatre CEPsh ont été visualisés à 40X avec le rapporteur *qvEx495 (Phlh-17C::myr::gfp)* en sélectionnant les vers transgénique qui exprimaient le rapporteur dans les quatre CEPsh. Une juxtaposition incomplète d'au moins une paire de cellules dorsale et ventrale constituait un défaut de chevauchement.

3.2.6 Marquage de neurones sensoriels par coloration lipophile

La coloration DiO (neurones en vert) ou DiI (neurones en rouge) permet un marquage de huit paires de neurones sensoriels : six dans la tête et deux dans la queue (Hedgecock et al., 1985). Un volume de 75 μ L de DiO/DiI dilué à 40 μ g/mL dans du tampon M9 a été déposé pendant une heure sur une plaque contenant des vers à observer. Les animaux ont par la suite été transférés sur une nouvelle plaque pendant 30 minutes avant l'observation.

3.2.7 Perturbation cellulaire par optogénétique

Une plaque montée sur glace contenant des vers au stade L4 a été illuminées 10 ou 15 minutes à \sim 10 cm sous une lampe LED (LXML-PR01-0500 *Luxeon Rebel high power LED*, *Luxeon Star LEDs*, *Quadica Developments Inc.*) émettant de la lumière bleue continue à 158 mW (440 à 460 nm, voir figure 21). Un volume de 40 μ L de CuSO_4 (150 mM) a été déposé sur la circonférence de la boîte de Pétri pour maintenir les animaux en son centre. Pour ne pas les confondre avec leur progéniture, les vers ont été transférés quotidiennement sur de nouvelles plaques jusqu'à leur observation, soit au 3^e jour d'âge adulte. Toutes les plaques ont été conservées dans l'obscurité jusqu'au moment de l'observation et les GLR ont été visualisés à 40X avec le rapporteur *qvIs10* et les CEPsh avec le rapporteur *vprIs156 (Phlh-17C::monomericDsRed)*. À noter que plusieurs essais infructueux avaient été tentés en utilisant le microscope à fluorescence *Imager M2* comme source lumineuse (voir tableau 8 en annexe) tel que décrit dans la littérature avant d'employer une lampe LED plus puissante (Qi and Xu, 2013).

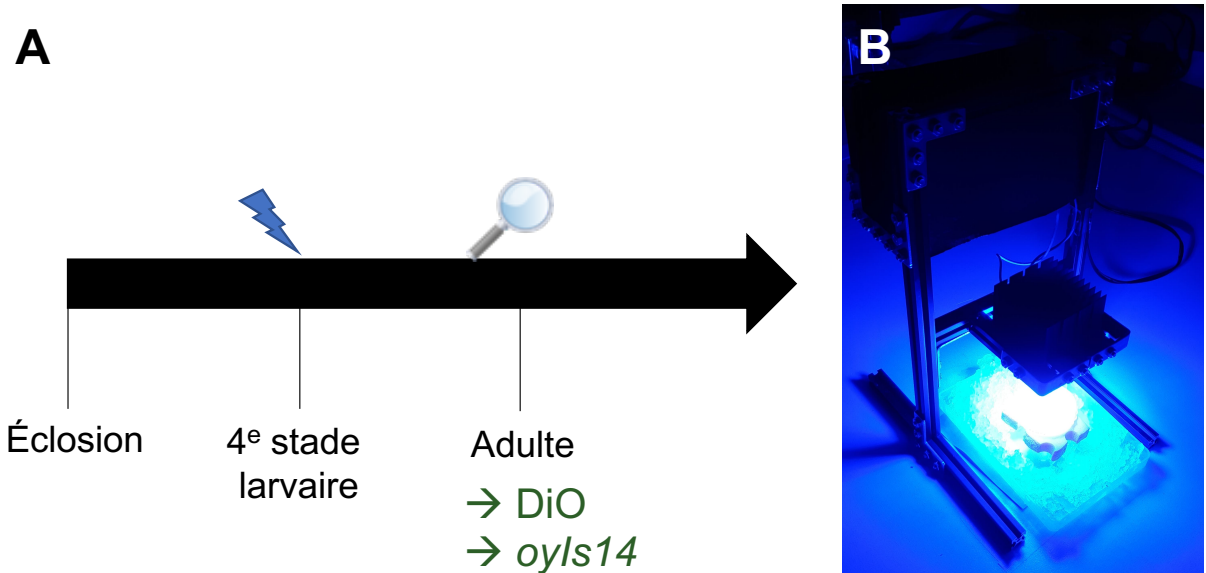


Figure 21. – L’approche *miniSOG* de perturbation des cellules gliales. (A) Représentation du déroulement des expériences d’optogénétique. L’illumination des cellules gliales avec de la lumière bleue se fait au 4^e stade larvaire, puis l’observation des structures du système nerveux se fait 3 jours plus tard, soit au jour 3 d’âge adulte. (B) Photo du montage utilisé pour illuminer une boîte de Pétri située à environ 10 cm de la source lumineuse.

3.2.8 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel R. Les résultats des figures sont exprimés en proportions \pm erreur standard de la proportion ou en moyennes \pm erreur standard de la moyenne. Des tests exacts de Fisher ont été effectués pour comparer les proportions et les valeurs-p ont été ajustées pour comparaisons multiples (correction Bonferroni). Des tests de Student ont servi à comparer deux moyennes. Les valeurs-p ont été considérées significatives lorsque $< 0,05$ (*), $0,01$ (**) ou $0,001$ (***)).

3.3 Résultats

3.3.1 Caractérisation morphologique des GLR chez le type sauvage

Une limitation majeure rencontrée en début de projet constituait le manque d’outils pour la visualisation spécifique des GLR, ces dernières ayant très peu été étudiées jusqu’à présent. Il a donc fallu identifier un promoteur dans la littérature pour être capable de cibler ce type cellulaire. Une version courte du promoteur *Pnep-2* sensée être spécifique aux GLR a précédemment été générée au moyen de *promoter bashing* par d’autres groupes, une méthode permettant de rendre un promoteur spécifique à un type cellulaire (Yamada et al., 2010; Meng et al., 2016).

La première étape était alors de fusionner un rapporteur fluorescent sous ce promoteur de 1468 paires de bases afin d'être en mesure de visualiser les six cellules gliales (Figure 22A; voir tableau 5). Une séquence de myristoylation de la famille des tyrosines kinases Src (GSCIGK) a été incluse en amont de *wrmScarlet* pour cibler le marqueur à la membrane et ainsi améliorer la visualisation des détails morphologiques des cellules (Adler et al., 2006).

Une fois le plasmide créé, ce dernier a été micro-injecté pour générer des lignées transgéniques. Sur les trois lignées obtenues (voir tableau 3), une a été retenue pour intégrer le réseau plasmidique extra-chromosomal dans le génome afin d'obtenir une expression stable dans les six GLR (voir sections 3.2.2 et 3.2.3 du matériel et méthodes). Au total, quatre intégrants ont été obtenus (voir tableau 3), et le projet a été poursuivi avec l'utilisation de *qvIs10* car il s'agissait de la souche présentant la plus forte intensité de fluorescence dans les cellules gliales. Un exemple du patron d'expression est présenté à la figure 22B. Il est possible d'observer que les GLR sont effectivement marquées au niveau de la tête, mais qu'une expression non spécifique est également présente, notamment dans les intestins, les coelomocytes et des neurones non identifiés au niveau de la queue. À noter qu'une expression dans des neurones des ganglions de la tête a aussi été détectée à des stades larvaires plus précoces et que celle-ci déclinait avec l'âge, mais persistait à très faible intensité à l'âge adulte, indiquant que *Pnep-2C* n'est malheureusement pas spécifique au GLR tel qu'il avait été rapporté dans la littérature (Yamada et al., 2010; Meng et al., 2016). Malgré tout, la souche intégrée a permis de caractériser la morphologie gliale à partir du 4^e stade larvaire.

Les six GLR ont été observées au 4^e stade larvaire et aux jours 2 et 5 d'âge adulte pour voir si des changements morphologiques survenaient durant la période de maintenance, avant que les vers ne soient avancés dans leur vieillissement. À la figure 22C, il est possible d'observer en vue latérale les corps cellulaires avec des prolongements cytoplasmiques en feuille qui s'étendent antérieurement et qui s'affinent pour rejoindre la partie la plus antérieure du *procorpus* de l'animal. Dû à l'organisation symétrique des six cellules, il est difficile de les discerner individuellement sur une projection de *z-stacks* telle que présentées ici, mais la morphologie des prolongements en feuille est très similaire d'une cellule à l'autre. Il est aussi à noter que l'expression du marqueur au niveau des GLR latérales droite et gauche est moins intense que pour les paires dorsale et ventrale, les rendant plus difficile à visualiser. Par ailleurs, les corps cellulaires des deux GLR dorsales sont légèrement antérieurs relativement aux GLR ventrales, ce qui est conséquent avec le fait que ces

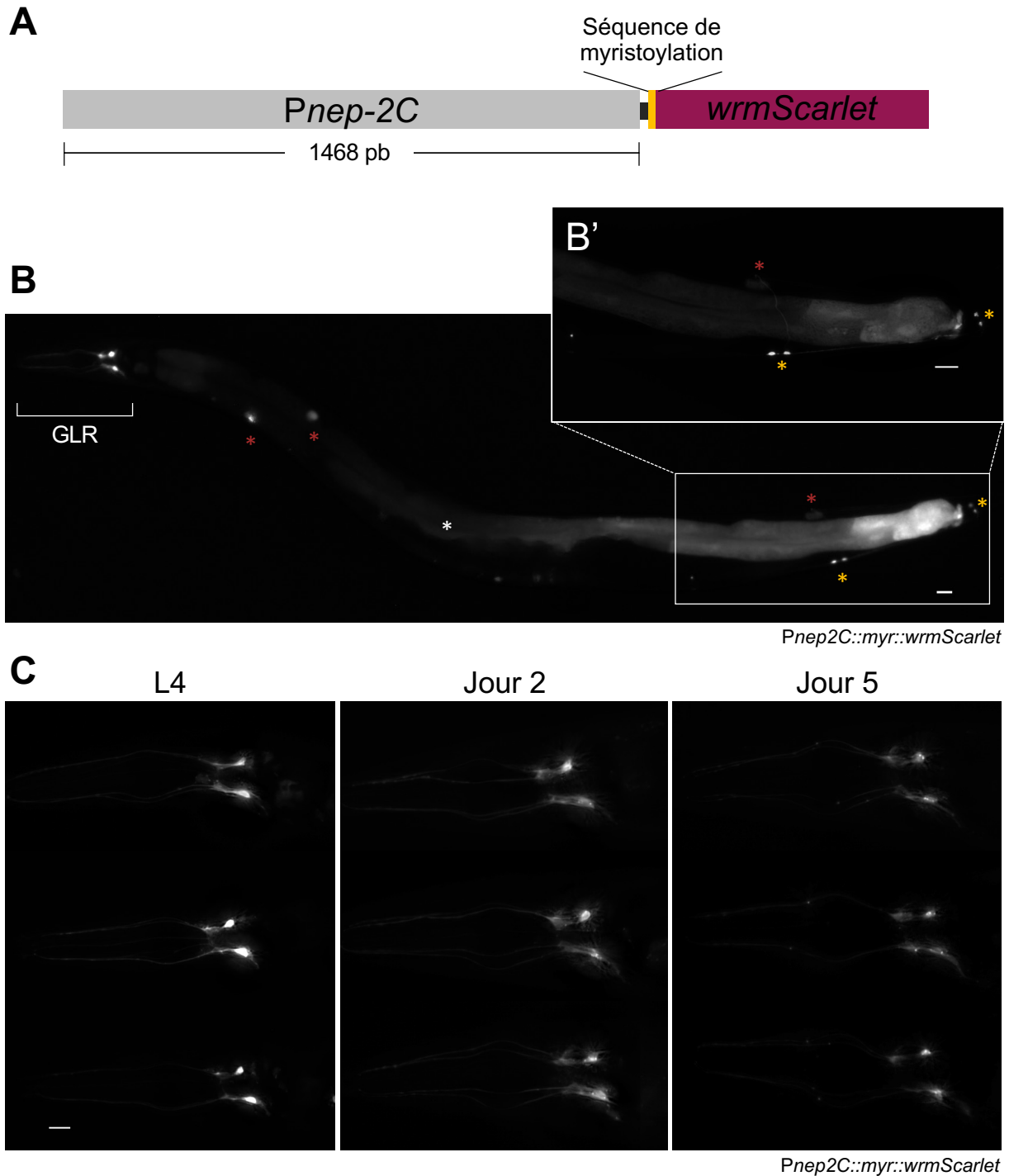


Figure 22. – Caractérisation morphologique des GLR chez le type sauvage. (A) Schématisation de la construction du rapporteur fluorescent *wrmScarlet* sous le contrôle du promoteur *Pnep-2C* spécifique au GLR. (B,B') Visualisation du patron d'expression du rapporteur *qvIs10* (*Pnep-2C::myr::wrmScarlet*) généré. Une expression du rapporteur est visible dans les GLR, mais également dans les coelomocytes (astérisques rouges), l'intestin (astérisque blanc) et des neurones de la queue (astérisques jaunes). (C) Visualisation des GLR au 4^e stade larvaire et aux jours 2 et 5 d'âge adulte avec le rapporteur *qvIs10* (*Pnep2C::myr::wrmScarlet*). Échelles : B = 20 μm ; B' et C = 10 μm . L4, 4^e stade larvaire ; pb, paire de base.

cellules tapissent l'intérieur de l'anneau nerveux possédant naturellement une inclinaison. Aucun changement morphologique majeur des GLR n'est survenu entre le 4^e stade larvaire et le jour 5 d'âge adulte, mis à part l'apparition de quelques puncta fluorescents au niveau du corps cellulaire des GLR à l'âge adulte. Cette analyse morphologique indique que l'apparence des GLR est similaire entre les six cellules et qu'elle est bien maintenue dans le temps.

3.3.2 Caractérisation morphologique des CEPsh chez le type sauvage

Le second type de cellules gliales d'intérêt pour ce projet sont les quatre CEPsh qui recouvrent l'anneau nerveux. Une lignée déjà générée au laboratoire a été utilisée pour la visualisation spécifique des CEPsh grâce au marqueur GFP ciblé à la membrane cellulaire sous le contrôle du promoteur court du gène *hlh-17* (1945 paires de bases). La construction du rapporteur est schématisée à la figure 23A. Similairement à l'analyse morphologique des GLR, l'observation des CEPsh s'est faite jusqu'au jour 5 d'âge adulte et des animaux plus jeunes, soit au 2^e stade larvaire, ont également pu être observés.

D'abord, les corps cellulaires, se situent au niveau du neuropile qu'ils recouvrent et un prolongement cytoplasmique fin rejoint des terminaisons nerveuses réceptives à l'extrémité antérieure du *procorpus*. Une morphologie distincte est présente à cet endroit, mais n'a pas été observée plus en détails, étant donné que les structures neuronales étudiées dans le cadre du projet de maintenance se situent davantage au niveau du bulbe postérieur du pharynx. Ensuite, une attention particulière a été portée à la propriété de *tiling* des CEPsh, ici nommée « chevauchement », rapportée dans la littérature (Singhvi and Shaham, 2019). Au 2^e stade larvaire, il est possible de constater un chevauchement incomplet chez certains individus (Figure 23B). Ce chevauchement est présent au 4^e stade larvaire, indiquant que le développement complet des CEPsh se poursuit durant la période post-natale. Aussi, à partir du 4^e stade larvaire, il est possible de discriminer les CEPsh ventrales des CEPsh dorsales en raison du fait que les CEPsh ventrales sont plus étendues dans l'axe antéro-postérieur que les CEPsh dorsales. Il est intéressant de noter que la vue latérale permet l'observation d'une structure membranaire en forme d'arc au niveau des CEPsh dorsales chez plusieurs animaux, vraisemblablement en raison du recouvrement de l'anneau nerveux au niveau de sa courbure dorsale. Enfin, il est possible d'observer une déformation membranaire au niveau des prolongements cytoplasmiques ainsi qu'une augmentation du

relâchement de structures ressemblant à des vésicules au jour 5 d'âge adulte comparativement aux stades larvaires, bien que la morphologie soit grossièrement préservée (Figure 23B, C).

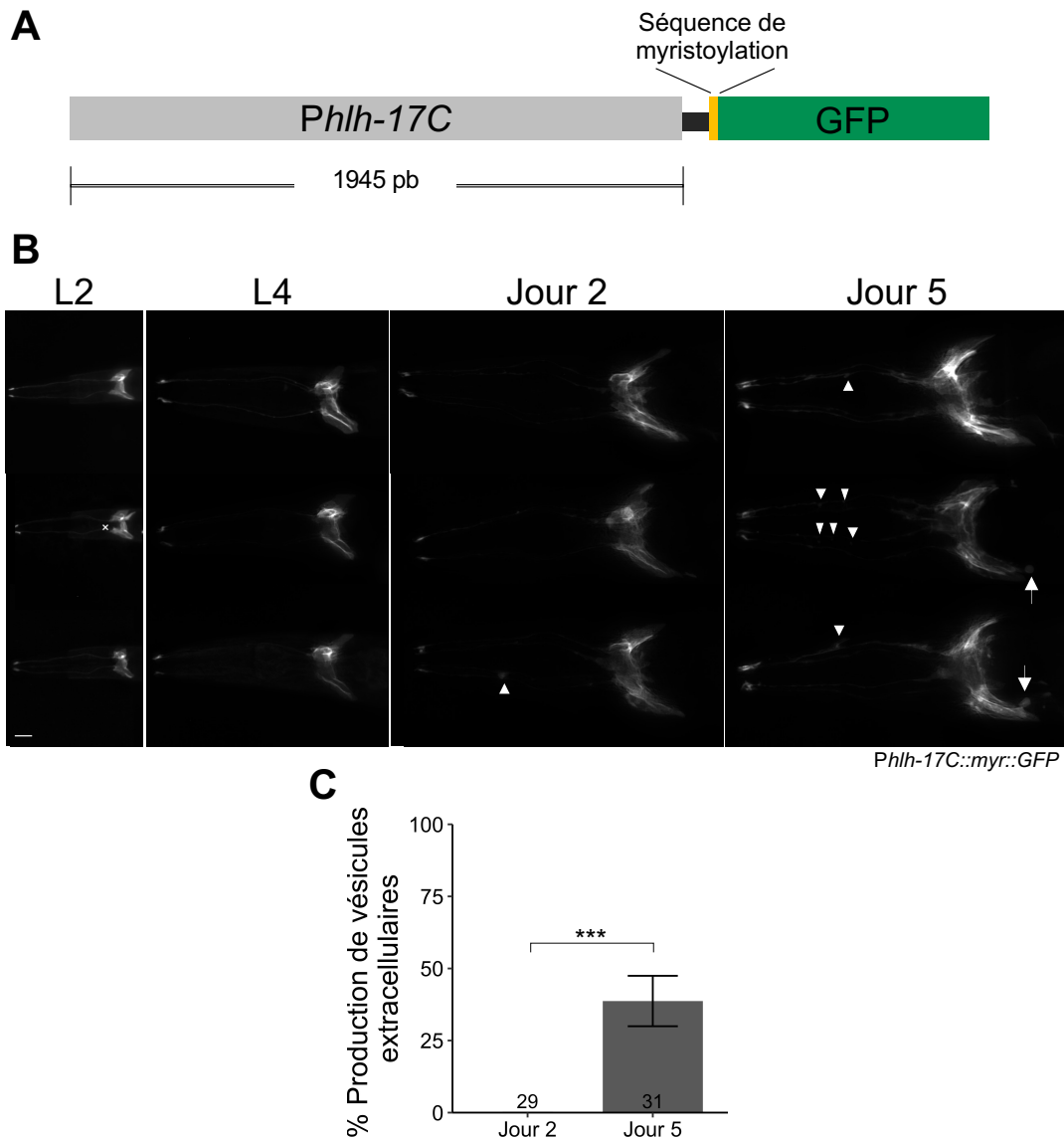


Figure 23. – Caractérisation morphologique des CEPsh chez le type sauvage. (A) Schématisation de la construction du rapporteur fluorescent GFP sous le contrôle du promoteur *Phlh-17C* spécifique au CEPsh. (B) Visualisation des CEPsh (en blanc) dans une lignée transgénique exprimant le rapporteur *Phlh-17C::myr::GFP* aux 2^e et 4^e stades larvaires et aux jours 2 et 5 d'âge adulte. Un exemple de chevauchement incomplet de CEPsh dorsales et ventrales au 2^e stade larvaire est indiqué (croix blanche) et des déformations au niveau des prolongements cytoplasmiques (pointes de flèches blanches) ainsi que des structures sphériques ressemblant à des vésicules (flèches blanches) sont visibles aux stades adultes. (C) Quantification du nombre d'animaux adultes (jours 2 et 5) produisant au moins une vésicule extracellulaire (Proportion \pm erreur standard de proportion, test exact de Fisher). Les tailles d'échantillons sont indiquées sur l'abscisse. La différence significative est indiquée par des astérisques (***) $p \leq 0,001$). Échelle = 10 μ m. L2, 2^e stade larvaire ; L4, 4^e stade larvaire ; pb, paire de base.

3.3.3 Perturbation post-développementale des GLR

Les cellules gliales possédant des rôles importants au sein du système nerveux, il se pourrait qu'elles soient requises pour maintenir à long terme l'intégrité de l'organisation neuronale. Dans l'optique d'amorcer l'exploration de leurs rôles en contexte de maintenance, une approche d'optogénétique a été employée pour avoir un contrôle spatio-temporel de la perturbation des cellules gliales à l'étude. Brièvement, lorsqu'illuminé par de la lumière bleue, le domaine protéique *miniSOG* ou « mini *Singlet Oxygen Generator* » produit des espèces réactives de l'oxygène qui sont toxiques pour la cellule, induisant alors sa dégénérescence par un mécanisme encore mal compris (Xu and Chisholm, 2016; Barnett et al., 2018). Grâce au contrôle temporel du moment d'illumination, il est possible de perturber les cellules gliales de manière post-développementale, après la formation initiale du système nerveux, afin d'en étudier l'impact sur les structures neuronales.

Premièrement, il a fallu générer les outils génétiques nécessaires permettant l'expression spécifique de la protéine *miniSOG* ciblé à la membrane des GLR. Pour ce faire, un domaine homologue de la pleckstrine « PH » suivi de *miniSOG* a été fusionnée sous le promoteur *Pnep-2C* décrit plus haut (voir tableau 5). La construction est schématisée à la figure 24A. À noter que la séquence de *miniSOG* utilisée comportait la mutation Q103L permettant d'augmenter l'efficacité de la méthode en réduisant le temps d'illumination requis pour affecter les cellules (Xu and Chisholm, 2016). Deuxièmement, le plasmide a été injecté dans la souche *qvIs10* décrite à la section 3.3.1 pour générer des lignées transgéniques dans laquelle les six GLR sont visibles en rouge (voir tableau 3). Enfin, deux méthodes ont été employées pour permettre l'observation des neurones sensoriels. La première consistait en l'usage de la coloration lipophile verte DiO, et la deuxième, un croisement d'une des lignées obtenues avec la souche *oyIs14* marquant les neurones ASH et ASI en vert.

Les animaux ont d'abord été illuminés 10 minutes avec de la lumière bleue au 4^e stade larvaire pour éviter tout effet sur le développement. Deux groupes ont servi de contrôles : 1) des vers illuminés, mais n'exprimant pas *miniSOG* dans les GLR et 2) des vers exprimant *miniSOG*, mais n'étant pas illuminés. L'observation des animaux au jour 3 d'âge adulte a permis de constater que les GLR n'étaient pas dégénérées et qu'aucun défaut de fasciculation du neuropile ou de position des corps cellulaires neuronaux n'étaient présents dans tous les groupes étudiés, suggérant

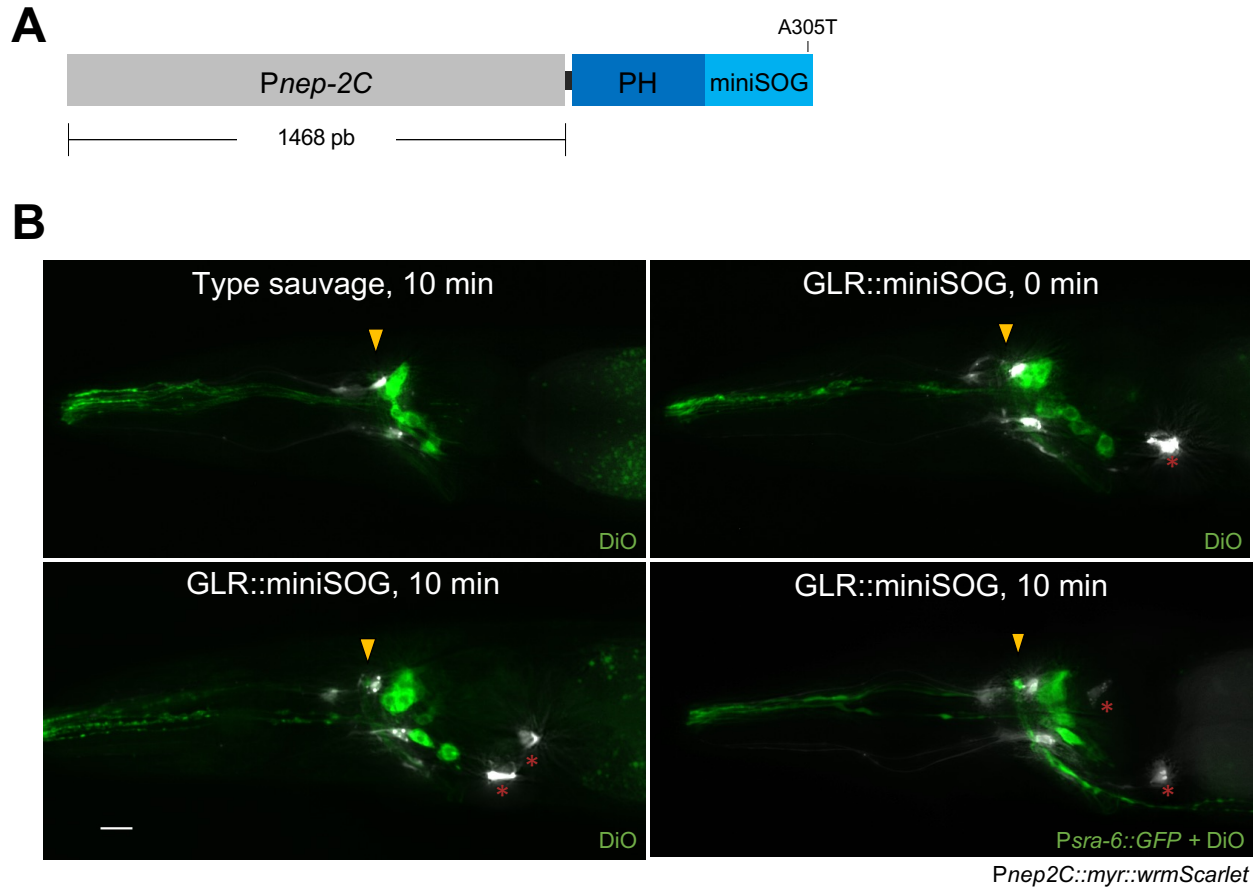


Figure 24. – Perturbation des GLR par *miniSOG* au 4^e stade larvaire. (A) Schématisation de la construction de l'expression de *PH::miniSOG* sous le contrôle du promoteur *Pnep-2C* spécifique au GLR. (B) Visualisation des GLR (en blanc) au jour 3 d'âge adulte avec le rapporteur *qvIs10* (*Pnep-2C::myr::wrmScarlet*) relativement aux structures neuronales (en vert) marquées avec la coloration DiO ou le rapporteur *oyIs14* (*Psra-6::GFP*). Les conditions d'illumination sont décrites dans chaque image. La position de l'anneau nerveux est indiquée avec des pointes de flèches jaunes et les neurones AIY exprimant le marqueur de co-injection (*Pttx-3::mCherry*) sont dénotés par des astérisques rouges. Échelles : B = 20 μ m ; B' et C = 10 μ m. L4, 4^e stade larvaire. pb, paire de base.

Tableau 6. – Résumé des essais de la perturbation des GLR par *miniSOG*.

Souche	Génotype	Temps d'illumination (minutes)	n	Animaux avec cœlomocytes visibles (%)	Défauts d'architecture neuronale (%)
VQ1797	<i>qvIs10; qvEx580 + DiO</i>	0	4	0	0
VQ1796	<i>qvIs10 + DiO</i>	10	20	0	0
VQ1797	<i>qvIs10; qvEx580 + DiO</i>	10	6	17	0
VQ1798	<i>qvIs10; oyIs14; qvEx580 + DiO</i>	10	8	0	0
VQ1798	<i>qvIs10; oyIs14; qvEx580 + DiO</i>	0	19	0	0
VQ1796	<i>qvIs10 + DiO</i>	15	7	0	0
VQ1798	<i>qvIs10; oyIs14; qvEx580 + DiO</i>	15	11	18	0

à première vue que la perturbation post-développementale des GLR n'aurait aucun impact sur l'architecture neuronale (Figure 24B; tableau 6). Cependant, une manière de savoir si les GLR ont bel et bien été affectées par l'activation de *miniSOG* est la présence d'agrégats fluorescents dans les cœlomocytes reflétant le processus d'élimination de débris cellulaires, or seul un individu a présenté une faible présence d'agrégats de fluorescence au niveau des cœlomocytes. Pour tenter d'augmenter l'efficacité de la méthode, une durée d'illumination de 15 minutes a été testée (Tableau 6). Malgré cette plus longue période d'illumination, l'architecture neuronale et gliale étaient intactes au jour 3 d'âge adulte. De plus, aucun ver n'a présenté d'agrégats au niveau des cœlomocytes. Cela indique que la méthode n'a probablement pas permis de perturber les GLR et il n'est pas possible de tirer de conclusion concernant le rôle des GLR dans la maintenance neuronale.

3.3.4 Perturbation post-développementale des CEPsh

Afin de spécifiquement perturber les CEPsh, des outils génétiques ont à nouveau dû être générés. Pour ce faire, la séquence de *miniSOG* précédé du domaine PH a cette fois-ci été clonée sous le promoteur *Phlh-17L* (Figure 25A; voir tableau 5). La forme longue du promoteur (2465 paires de bases) plutôt que la courte (1945 paires de bases) a été employée puisqu'il a été rapporté dans la littérature que *Phlh-17C* était non spécifique à certains stades larvaires, et que la spécificité du promoteur utilisé est importante pour assurer un bon contrôle spatial de l'activité de *miniSOG* (Fung et al., 2020). Le plasmide a été injecté dans la souche *vprIs156* pour générer des lignées transgéniques dans laquelle les quatre CEPsh sont visibles en rouge (voir tableau 3). Une de ces lignées a ensuite été croisée avec la souche *oyIs14* pour visualiser des neurones en combinaison avec la coloration DiO.

Tout comme ce qui avait été réalisé pour la perturbation des GLR, les animaux ont subi 10 minutes d'illumination au 4^e stade larvaire pour ensuite être observés au jour 3 d'âge adulte. L'illumination du groupe témoin qui n'exprime pas *miniSOG* n'a eu aucun effet sur la morphologie des CEPsh et sur les structures neuronales (Figure 25C; tableau 7). En revanche, des indications de dégénération des cellules gliales étaient apparentes chez tous les animaux exprimant *miniSOG*, peu importe s'ils étaient illuminés ou non. En effet, des cœlomocytes normalement non marqués chez le groupe témoin illuminé devenaient fluorescents, dû à la présence de marqueur servant à visualiser les CEPsh (Figure 25B). Il est peu probable que le marquage ait été causé par le marqueur

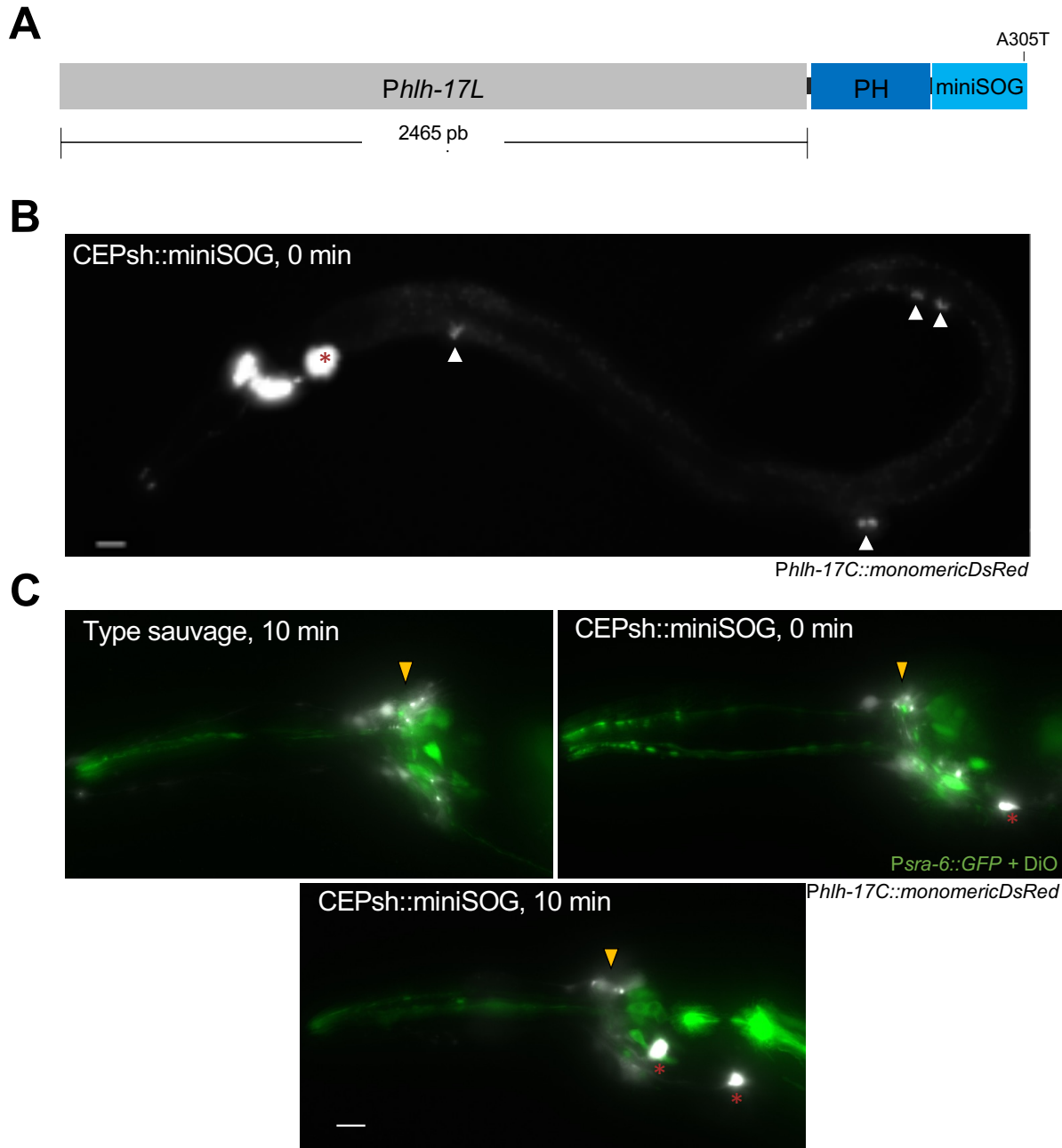


Figure 25. – Perturbation des CEPsh par *miniSOG* au 4^e stade larvaire. (A) Schématisation de la construction de l'expression de *PH::miniSOG* sous le contrôle du promoteur *Phlh-17L* spécifique au CEPsh. (B) Visualisation des CEPsh (en blanc) avec le rapporteur *vprIs156* (*Phlh-17C::monomericDsRed*) au 3^e jour d'âge adulte. Des coelomocytes (pointes de flèches blanches) deviennent visibles malgré l'absence d'illumination des animaux. (C) Visualisation des CEPsh (en blanc) au jour 3 d'âge adulte avec le rapporteur *vprIs156* (*Phlh-17C::monomericDsRed*) relativement aux structures neuronales (en vert) marquées avec la coloration DiO et le rapporteur *oyIs14* (*Psra-6::GFP*). La position de l'anneau nerveux est indiquée avec des pointes de flèches jaunes et les neurones AIY exprimant le marqueur de co-injection (*Pttx-3::mCherry*) sont indiqués avec des astérisques rouges. Les conditions d'illumination sont décrites dans chaque image. Échelles : B = 20 μ m ; C = 10 μ m. pb, paire de base.

Tableau 7. – Résumé des essais de perturbation des CEPsh par *miniSOG*.

Souche	Génotype	Temps d'illumination (minutes)	n	Animaux avec coelomocytes visibles (%)	Défauts d'architecture neuronale (%)
VQ1820	<i>vprIs156; oyIs14; qvEx586</i> + DiO	0	25	100	8
VQ1819	<i>vprIs156; oyIs14</i> + DiO	10	31	0	0
VQ1820	<i>vprIs156; oyIs14; qvEx586</i> + DiO	10	42	100	2

de co-injection utilisé, soit *Pttx-3::mCherry*, car le même effet aurait été observé lors des expériences de perturbation des GLR décrites plus haut. Ce résultat indique alors que les CEPsh ont été affectées par la présence de *miniSOG*, indépendamment de l'activation par la lumière bleue. Par ailleurs, aucun défaut de fasciculation du neuropile n'a été observé. Cependant, sur les 67 vers exprimant *miniSOG*, qu'ils soient illuminés ou non, trois ont présenté un déplacement antérieur d'au moins un neurone par rapport à l'anneau nerveux, contrairement au groupe témoin n'ayant présenté aucun défaut de ce type. Une perturbation des CEPsh pourrait donc influencer le maintien de l'architecture neuronale, mais il semble que les expériences avec *miniSOG* n'ont pas présenté de spécificité temporelle attendue par l'emploi de cette technique d'optogénétique, rendant difficile de conclure quant au rôle post-développemental des CEPsh sur la protection de l'architecture neuronale.

3.3.5 Observation des GLR chez les mutants de maintenance *sax-7*

Après avoir exploré le rôle des cellules gliales pour la maintenance des structures neuronales, le contexte de maintenance sera abordé sous un autre angle, soit en testant l'importance de la molécule *sax-7* pour la maintenance des cellules gliales, en commençant par les GLR.

Pour visualiser les GLR chez les mutants *sax-7*, un croisement de ces derniers avec la souche exprimant le rapporteur fluorescent de manière stable décrite à la section 3.3.1 a été réalisé. Cependant, l'insertion du réseau plasmidique extra-chromosomal dans le génome s'étant produite sur le même chromosome que *sax-7*, la production d'un recombinant a été tentée, mais s'est résolue en un échec. Un transfert du réseau plasmidique extra-chromosomal chez les mutants *sax-7* a donc été effectué afin de tout de même permettre l'observation des GLR, malgré une expression mosaïque du marqueur fluorescent.

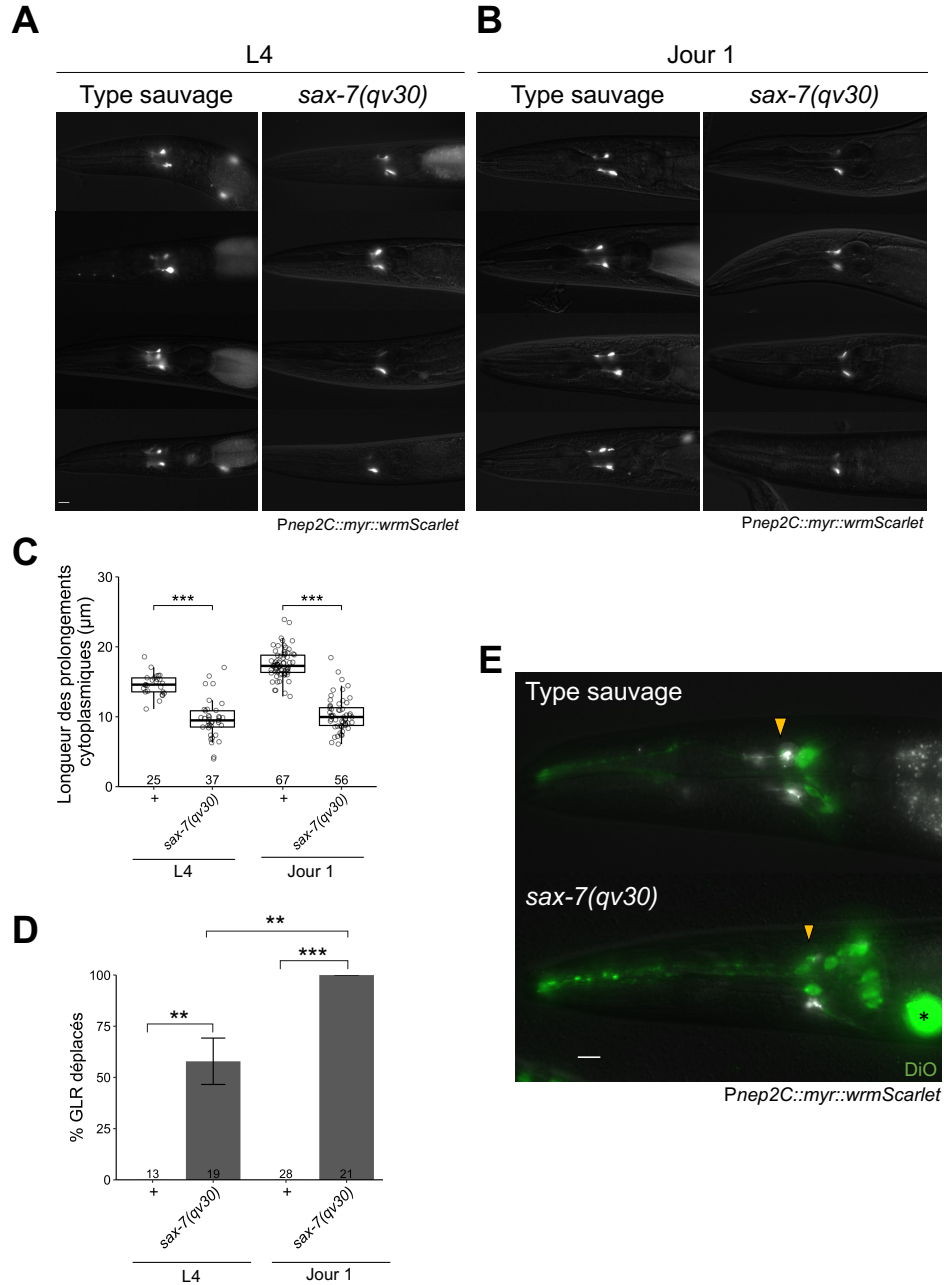


Figure 26. – Les mutants de maintenance *sax-7* présentent des défauts morphologiques des GLR. Visualisation des GLR au 4^e stade larvaire (A) et au jour 1 d'âge adulte (B) dans une lignée transgénique exprimant *Pnep-2C::myr::wrmScarlet*. (C) Mesures des prolongements cytoplasmiques en feuille 4^e stade larvaire et au jour 1 d'âge adulte (Boîtes à moustaches avec points individuels, tests de Student). (D) Quantification du déplacement postérieur des GLR lorsque ces derniers touchaient le bulbe postérieur du pharynx (Proportion \pm erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). (E) Visualisation des GLR (en blanc) au jour 1 d'âge adulte avec le rapporteur *Pnep-2C::myr::wrmScarlet* relativement aux structures neuronales (en vert) marquées avec la coloration DiO. La position de l'anneau nerveux est indiquée avec des pointes de flèches jaunes. Les tailles d'échantillon sont indiquées sur les abscisses. Échelle = 10 μm . L4, 4^e stade larvaire.

L'observation des animaux au jour 1 d'âge adulte a permis de constater des défauts morphologiques des GLR, notamment un raccourcissement des prolongements cytoplasmiques en feuille chez les mutants *sax-7* comparativement au type sauvage (Figure 26B, C). De plus, lors de la prise d'images, l'intensité de fluorescence était plus faible chez les mutants *sax-7* que chez le type sauvage et il était impossible de visualiser les prolongements antérieurs. Par ailleurs, la position antéro-postérieure des GLR est altérée. En effet, il est possible de constater que chez les mutants *sax-7*, les GLR sont apposées contre le bulbe terminal du pharynx, contrairement au type sauvage où les cellules gliales sont situées plus antérieurement, au milieu de l'isthme (Figure 26A, B).

Pour déterminer si ces défauts sont de l'ordre de la maintenance, des animaux plus jeunes ont été observés pour vérifier si les GLR se développent normalement, mais deviennent défectueux par la suite. Au 4^e stade larvaire, les défauts de longueur des prolongements cytoplasmiques en feuille sont déjà présents, ce qui suggère que ces défauts seraient développementaux (Figure A, C). En ce qui a trait aux défauts de positionnement, plusieurs animaux possèdent déjà des GLR postérieurs au 4^e stade larvaire, mais à plus faible pénétrance qu'au jour 1 d'âge adulte (Figure 26A, D). Ce résultat indique que le déplacement postérieur des GLR pourrait constituer un défaut de maintenance, étant donné l'aggravation observée dans le temps.

Vu la proximité des GLR avec l'anneau nerveux, une coloration de neurones sensoriels au DiO a été effectuée afin d'explorer un potentiel lien entre les défauts de maintenance neuronale et de déplacement postérieur des GLR. L'organisation relative de l'anneau nerveux avec les GLR est-elle maintenue? La co-localisation des deux structures a permis de mettre en évidence que le neuropile, normalement situé juste antérieurement aux corps cellulaires des GLR, se déplace postérieurement avec ces cellules gliales chez les mutants *sax-7* (Figure 26E). Ce résultat amène l'idée que le déplacement des GLR pourrait influencer les défauts de maintenance neuronale ou vice versa.

3.3.5 Observation des CEPsh chez les mutants de maintenance *sax-7*

Pour visualiser le second type de cellules gliales à l'étude, les CEPsh, chez les mutants *sax-7*, un transfert du réseau plasmidique extra-chromosomal contenant un rapporteur spécifique (voir section 3.3.2) a été effectué.

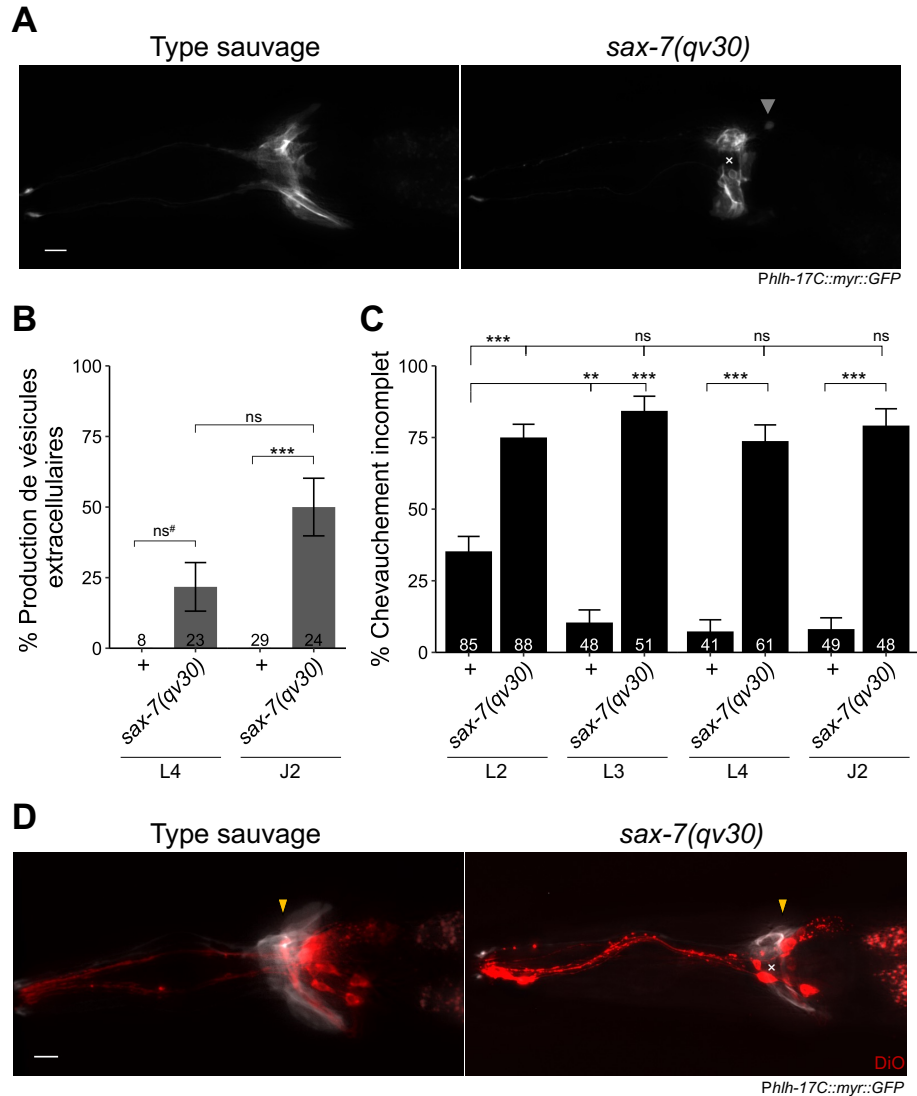


Figure 27. – Les mutants de maintenance *sax-7* présentent des défauts morphologiques des CEPsh. (A) Visualisation des CEPsh au jour 2 d'âge adulte dans une lignée transgénique exprimant le rapporteur *Phlh-17C::myr::GFP*. L'absence de chevauchement des CEPsh chez les mutants *sax-7* est dénoté par une croix blanche et la production d'une structure sphérique ressemblant à une vésicule est indiquée par une pointe de flèche grise. (B) Quantification du nombre d'animaux au 4^e stade larvaire et au jour 2 d'âge adulte produisant au moins une vésicule extracellulaire (Proportion \pm erreur standard de proportion, test exact de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). (C) Quantification du nombre d'animaux présentant un chevauchement incomplet des CEPsh (Proportion \pm erreur standard de proportion, test exact de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). (D) Visualisation des CEPsh (en blanc) au jour 1 d'âge adulte avec le rapporteur *Phlh-17C::myr::GFP* relativement aux structures neuronales (en rouge) marquées avec la coloration DiI. La position de l'anneau nerveux est indiquée avec des pointes de flèches jaunes. Les tailles d'échantillon sont indiquées sur les abscisses. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). ns, non significatif. ns[#], comparaison non significative due au faible nombre d'animaux de type sauvage pris en photo (n=8); au fait >30 animaux de type sauvage ont été observés et aucun ne présentait de vésicules extracellulaires, donc la valeur-p est en fait surévaluée. Échelles = 10 μ m.

La perte de fonction de *sax-7* a entraîné l'apparition de changements morphologiques des CEPsh. En effet, les mutants *sax-7* présentent une augmentation de relâchement de vésicules membranaires dans l'espace extracellulaire comparativement au type sauvage dès le 4^e stade larvaire (Figure 27A, B). Par ailleurs, la présence d'un chevauchement incomplet des CEPsh dorsales et ventrales était significativement plus élevé chez les mutants *sax-7* que chez le type sauvage au jour 2 d'âge adulte (Figure 27A). Pour vérifier si ces défauts étaient déjà présents après le développement complet des CEPsh, des animaux du 2^e au 4^e stade larvaire ont été analysés. Au 2^e stade larvaire, plusieurs animaux du type sauvage présentent un chevauchement incomplet des CEPsh comme cela a déjà été mentionné lors de la caractérisation morphologique de ces cellules (Figure 27C). Au 3^e stade larvaire, il y a une diminution significative du nombre de vers ayant un chevauchement incomplet comparativement au 2^e stade larvaire, indiquant que la formation des CEPsh est complétée à ce stade. Cette pénétrance de chevauchement incomplet est ensuite stable dans le temps jusqu'à l'âge adulte. Concernant les mutants *sax-7*, ces derniers présentent significativement plus de chevauchement incomplet que le type sauvage à tous les stades étudiés (Figure 27C). À mentionner également que l'expressivité du phénotype observé était plus importante chez les mutants *sax-7* que chez le type sauvage. En effet, il était très rare de pouvoir observer un « trou » chez le type sauvage comme c'était le cas chez les mutants, hormis à quelques reprises lors de l'étude du 2^e stade larvaire. Ces résultats portent donc à croire que *sax-7* serait important pour le développement de la morphologie des CEPsh.

Pour tenter de mettre en relation le phénotype des CEPsh chez les mutants *sax-7* avec les défauts de maintenance neuronale, une coloration lipophile DiI a été employée pour marquer des neurones sensoriels à proximité des CEPsh (Figure 27D). Chez le type sauvage, l'anneau nerveux épouse la forme des CEPsh et les neurones y sont situés postérieurement tandis que chez les mutants *sax-7*, certains neurones dépassent antérieurement l'anneau nerveux, à l'endroit où une absence de chevauchement des cellules gliales est visible. Cela suggère que les défauts de chevauchement des CEPsh pourraient être impliqués dans l'apparition des défauts d'organisation neuronale des mutants de maintenance *sax-7*.

3.4 Discussion

Le deuxième axe de l'étude visait à explorer l'implication des cellules gliales dans la maintenance de l'architecture du système nerveux. Les cellules gliales ont le potentiel d'influencer

la protection à long terme l'architecture neuronale en raison de leur proximité avec les neurones et de leur implication dans presque toutes, si ce n'est l'entièreté, des fonctions du système nerveux.

D'une part, l'approche d'optogénétique *miniSOG* a été employée pour perturber les fonctions de deux types de cellules gliales chez le nématode : les GLR et les CEPsh. L'objectif était d'acquérir une précision spatiotemporelle d'identification des fonctions gliales post-développementales qui relèveraient de la maintenance. La mise au point de la méthode au laboratoire a donc été le premier objectif de ce volet du projet. Les résultats préliminaires obtenus suivant une perturbation des cellules gliales au 4^e stade larvaire ne permettent pas pour l'instant de tirer de conclusions quant aux rôles de maintenance neuronale des GLR et des CEPsh étant donné que certains problèmes techniques ont été rencontrés. Ces derniers seront discutés plus en détails dans les prochaines sections et des pistes de solutions seront abordées.

D'autre part, l'exploration des GLR et CEPsh a été effectuée en les étudiant sous un autre angle, soit en identifiant de possibles défauts de maintenance des cellules gliales. À cette fin, une caractérisation morphologique des deux types de cellules gliales a été effectuée chez les mutants *sax-7*. Des altérations ont été relevées pour les GLR et les CEPsh chez les mutants *sax-7*. Les GLR montrent un déplacement postérieur de leur corps cellulaire et leur prolongement cytoplasmique en feuille est plus court que chez le type sauvage. En ce qui concerne les CEPsh, une augmentation de la sécrétion de vésicules et des défauts de chevauchement ont été observés. Ces anomalies pourraient être liées aux phénotypes neuronaux présents chez les mutants de maintenance *sax-7* et seront discutées plus loin. Enfin, de futures perspectives en lien avec l'exploration gliale chez *C. elegans* seront présentées.

3.4.1 Inefficacité de *miniSOG* exprimée dans les GLR

La perturbation des GLR par *miniSOG* n'a entraîné aucun défaut d'organisation de neurones sensoriels ou de défasciculation du neuropile. Aussi, l'apparition d'agrégats fluorescents dans les cœlomocytes était censée indiquer que la méthode avait été efficace, mais aucun agrégat n'a pu être observé chez les vers illuminés 10 ou 15 minutes avec de la lumière bleue, ce qui aurait dû être largement suffisant (Xu and Chisholm, 2016). Deux hypothèses pourraient expliquer cette inefficacité de la perturbation des GLR.

Premièrement, les GLR pourraient être résistantes à la production d'espèces réactives de l'oxygène par *miniSOG* ce qui serait en accord avec le fait que certaines cellules semblent plus sensibles que d'autres. Par exemple, dans une souche censée affecter les motoneurones cholinergiques (*Punc-17β::PH::miniSOG*), *miniSOG* était davantage efficace dans les neurones DA et DB que les neurones VA et VB (Fouad et al., 2018).

Deuxièmement, il se pourrait que la méthode n'ait tout simplement pas été efficace dû à des conditions sous-optimales. Idéalement, un changement dans la morphologie des cellules atteintes aurait dû être une indication supplémentaire de l'efficacité de *miniSOG*, comme ce qui avait été décrit par les chercheurs ayant développé la méthode (Xu and Chisholm, 2016). Comme la réalité s'est avérée être plus complexe et que les changements phénotypiques des cellules semblent subtils dans certaines cellules, il faudrait être en mesure de s'assurer que *miniSOG* est bel et bien exprimée et fonctionnelle dans les GLR.

3.4.1.1 Piste de solution : suivre et augmenter l'expression de *miniSOG*

Pour ce faire, une lignée co-exprimant les plasmides pCB470 [*Pnep-2C::myr::gfp*] et pCB465 [*Pnep-2C::PH::miniSOG(Q103L)*] générés au cours de cette maîtrise aiderait à suivre l'expression de *miniSOG*. Autrement, la concentration utilisée pour les injections n'est peut-être pas encore optimale. Le plasmide exprimant *miniSOG* dans les GLR avait initialement été injecté à une concentration de 75 ng/μL, mais comme aucun effet n'avait été observé, la concentration a été augmentée à 100 ng/μL. Des essais supplémentaires d'injections de concentrations croissantes du plasmide pourraient être menés pour vérifier si ce sont les niveaux d'expression qui sont en cause. Ensuite, l'intégration du réseau plasmidique extra-chromosomal dans le génome permettrait d'assurer une expression stable de *miniSOG* simultanément dans les six GLR. Alternativement, si ces solutions n'améliorent pas l'efficacité de la méthode, d'autres mesures pourraient être prises en modifiant le protocole d'illumination des vers exprimant *miniSOG*.

3.4.1.2 Piste de solution : modification du protocole d'illumination

Dans les travaux présentés ici, des vers au 4^e stade larvaire étaient illuminés 10 ou 15 minutes avec de la lumière bleue continue. Certains expérimentateurs ont également utilisé de la lumière pulsée pour améliorer l'efficacité de la perturbation cellulaire (Qi et al., 2012; Leinwand and Chalasani, 2013; Xu and Chisholm, 2016; Xu et al., 2018). Une première solution serait l'ajout d'un obturateur à la source lumineuse pour contrôler la pulsation de la lumière à 0,5 Hz avec un

rapport cyclique de 25 % en marche. Par ailleurs, l'illumination des nématodes pourrait s'effectuer à un stade plus jeune, par exemple au 2^e stade larvaire, et pourrait même être répétée dans le temps (p.ex. quotidiennement jusqu'au jour 3 d'âge adulte). Cela permettrait de vérifier si la perturbation n'est observable que plusieurs jours suivant l'illumination des cellules, si les GLR sont plus sensibles aux réactifs dérivés de l'oxygène chez des jeunes larves et si l'illumination répétée augmente cette susceptibilité.

Une limitation à prendre en compte est le manque de spécificité du promoteur au niveau de la tête à ce stade larvaire dont il a été question à la section 3.3.1. *Pnep-2C* est le promoteur le plus spécifique aux GLR retrouvé dans la littérature. Le peu d'études portant sur les GLR contribue au manque d'outils nécessaires pour les étudier. Cependant, l'étude des cellules gliales chez *C. elegans* étant en plein essor, un groupe a débuté l'investigation des rôles développementaux des GLR et a notamment identifié un promoteur encore gardé secret qui serait spécifique à ces cellules gliales (Nikolaos Stefanakis du laboratoire du Dr Shai Shaham, communication personnelle). Une autre avenue serait l'emploi d'un système d'expression bipartite ou de la technique de *promoter bashing* pour obtenir une expression spécifique aux GLR durant les stades larvaires.

3.4.2 Contrôle temporel problématique de la perturbation des CEPsh

En ce qui a trait à la perturbation post-développementale des CEPsh, tous les vers qui exprimaient *miniSOG* ont présenté des débris fluorescents dérivant possiblement de la dégradation des CEPsh dans les cœlomocytes. Toutefois, le groupe témoin non illuminé présentant également ce phénotype, cela suggère que les CEPsh ont été perturbées indépendamment de l'illumination avec de la lumière bleue. La limitation principale de cette expérience était donc un mauvais contrôle temporel de l'activité délétère de *miniSOG*. Par ailleurs, des défauts de superposition de neurones sur le neuropile ont cependant pu être repérés en très faible quantité parmi tous les vers ayant présenté des agrégats au niveau des cœlomocytes, contrairement au second groupe témoin n'exprimant pas *miniSOG* qui lui n'a présenté aucun défaut d'organisation neuronale. Il faut aussi garder en tête que l'expression de *miniSOG* était mosaïque dans les lignées transgéniques. Il est alors possible que la perturbation simultanée des quatre cellules gliales soit requise pour engendrer des défauts neuronaux en raison de possibles mécanismes compensatoires entre les cellules, et que la faible pénétrance est en réalité sous-estimée. Ce résultat préliminaire évoque tout de même la

possibilité qu'une perturbation des CEPsh puisse influencer l'architecture neuronale, mais certains moyens devront être pris pour obtenir des résultats plus convaincants.

3.4.2.1 Piste de solution : suivre et diminuer l'expression de *miniSOG*

Similairement à ce qui a été proposé plus haut pour repérer quelles cellules expriment *miniSOG*, une lignée co-exprimant les plasmides pCB469 [*Phlh-17L::myr::gfp*] et pCB468 [*Phlh-17L::PH::miniSOG(Q103L)*] pourrait être générée pour identifier quel nématode exprime *miniSOG* dans les quatre CEPsh. De plus, il est possible que l'activation constitutive de *miniSOG* sans illumination soit due à l'injection d'une concentration trop élevée du plasmide. Une diminution de la concentration de *miniSOG* injectée pourrait aider à améliorer le contrôle temporel de son activation.

3.4.2.2 Piste de solution : obtenir une souche d'expression stable de *miniSOG*

Compte tenu des quelques vers ayant présenté des défauts d'organisation neuronale, une intégration du réseau plasmidique extra-chromosomal dans le génome une fois la dose optimale repérée serait nécessaire pour confirmer le phénotype observé. Cela éviterait tout mosaïcisme dans l'expression de *miniSOG* et la possible mise en marche de mécanismes compensateurs, permettant ainsi d'avoir une meilleure idée de la pénétrance réelle des défauts et de déterminer si ceux-ci sont significatifs.

3.4.3 Altération des GLR chez les mutants *sax-7*

3.4.3.1 Diminution de l'intensité de fluorescence

Lors de la prise d'images pour l'analyse des GLR des mutants *sax-7*, une découverte fortuite concernait la faible fluorescence du rapporteur *Pnep-2::myr::wrmScarlet* chez les mutants *sax-7* comparativement au type sauvage. Cette observation suggère qu'il existe une régulation négative de *Pnep-2* à la suite d'une perte de fonction de *sax-7*.

Homologue de la néprilysine, NEP-2 est une métallopeptidase transmembranaire prédite pour lier le zinc qui possède des rôles dans la plasticité de l'olfaction chez *C. elegans* (Yamada et al., 2010). En outre, une mutation dans le domaine extracellulaire de L1CAM dans des cellules colorectales humaines cancéreuses abolit les niveaux d'ARN messagers et protéiques de la néprilysine, et diminue la prolifération et motilité cellulaire ainsi que le développement de

métastases (Haase et al., 2017). Il existe donc une possibilité que la régulation de SAX-7/L1CAM sur NEP-2/Néprisyline soit un mécanisme conservé chez le nématode pouvant potentiellement induire des altérations cellulaires.

3.4.3.2 Raccourcissement des prolongements en feuille

Une caractéristique importante des GLR est la présence de domaines intermédiaires en forme de feuille qui séparent le pharynx des plaques terminales musculaires et du neuropile (Altun and Hall, 2009). Ces derniers sont plus courts chez les mutants de maintenance *sax-7* et semblent plus minces, ce qui pourrait entraîner un moins bon recouvrement de l'intérieur de l'anneau nerveux. Il a été rapporté qu'une altération développementale du joint formé par les GLR entre les muscles et le pharynx puisse avoir un impact dans la dégénérescence neuronale et de l'épiderme présente chez les vers arrêtés au 1^{er} stade larvaire suite à l'ablation des cellules mères des GLR (Altun and Hall, 2009). Chez les mutants *sax-7*, ce phénotype d'arrêt en stade L1 n'est pas présent, mais SAX-7 pourrait tout de même jouer un rôle pour maintenir l'adhésion entre les GLR et influencer leur rôle de joint de séparation des tissus.

Les résultats de longueur des prolongements en feuille des GLR au 4^e stade larvaire et au jour 1 d'âge adulte ne permettent pas de déterminer si ces défauts sont développementaux ou de maintenance. Pour ce faire, il faudrait être en mesure d'étudier la morphologie gliale plus tôt durant les stades larvaires afin de déterminer si la longueur des prolongements est significativement différente du type sauvage et devient défectueuse par la suite. Cependant, l'expression ectopique du rapporteur fluorescent dans d'autres neurones rendait impossible de mener cette analyse à des stades larvaires plus précoces et l'obtention d'un promoteur plus spécifique est nécessaire (voir aussi section 3.4.1.2). Cela permettrait également de vérifier si les fins prolongements cytoplasmiques antérieurs sont présents ou si l'incapacité de les visualiser résultait d'une intensité de fluorescence trop faible chez les mutants *sax-7*.

3.4.3.3 Défaut de positionnement dans l'axe antéro-postérieur

Une autre altération des GLR observée chez les mutants *sax-7* est l'apposition des corps cellulaires contre le bulbe terminal du pharynx, dénotant un positionnement plus postérieur. De manière intéressante, la proportion de vers possédant un placement postérieur des GLR augmente entre le 4^e stade larvaire et jour 1 d'âge adulte. Cela révèle que les défauts semblent empirer avec le temps et puissent être de l'ordre de la maintenance. Un parallèle intéressant à faire concerne la

désorganisation progressive des ganglions neuronaux à partir du 2^e stade larvaire chez les mutants *sax-7*, incluant un déplacement de l'anneaux nerveux (Desse et al., 2021). Cela est cohérent avec le fait que les GLR sont intimement liées au neuropile et que ces deux structures semblent similairement affectées suite à une perte de fonction de *sax-7*. Est-ce alors le déplacement des cellules gliales qui engendre les défauts de placement de l'anneau nerveux? Ou est-ce plutôt un déplacement postérieur de l'ensemble des deux structures qui survient? De futures expériences seront proposées dans la section des perspectives pour répondre à ces questions.

3.4.4 Altération des CEPsh chez les mutants *sax-7*

3.4.4.1 Relâche de vésicules membranaires

Un constat qui avait été fait chez les vers plus âgés, soit au jour 5 d'âge adulte, est la présence de larges vésicules membranaires extracellulaires qui rappelle le phénomène de sécrétion d'*exophers* par les neurones, un mécanisme proposé pour préserver l'homéostasie cellulaire (Melentijevic et al., 2017). Il se peut que les CEPsh puissent également sécréter ce genre de vésicules pour maintenir la protéostasie au fil du temps, ce qui serait reflété par la plus haute production de vésicules au jour 5 d'âge adulte comparativement au jour 2 d'âge adulte. Cependant, près de 50 % des mutants *sax-7* présentent déjà des vésicules extracellulaires au jour 2 d'âge adulte, indiquant une possible altération de la protéostasie ou une augmentation du stress oxydatif de manière précoce chez les mutants *sax-7*. Il serait pertinent de faire un marquage de mitochondries et de mitochondries endommagées pour vérifier si les vésicules sécrétées par les CEPsh contiennent des organelles endommagées, cela constituerait une indication supplémentaire qu'il s'agit bien d'*exophers*. Éventuellement, lorsque des méthodes d'isolation d'*exophers* seront établies, caractériser le contenu des vésicules sécrétées par les CEPsh serait une opportunité pour comprendre quelles voies sont déséquilibrées chez les mutants de maintenance.

3.4.4.2 Défaut de recouvrement du neuropile

En plus d'affecter la morphologie des GLR qui tapissent l'intérieur de l'anneaux nerveux, une perte de fonction du facteur de maintenance *sax-7* a entraîné l'apparition de défauts de chevauchement ou *tiling* des CEPsh qui recouvrent le neuropile. Ces défauts étant déjà présents au moment où les CEPsh sont complètement formées, soit au 3^e stade larvaire, il est possible de les

qualifier de défauts développementaux. La protéine d'adhésion SAX-7 serait donc requise pour assurer le contact entre les quatre cellules gliales.

Toutefois, ces défauts développementaux peuvent être d'importance dans la maintenance des structures neuronales, d'autant plus que les défauts de maintenance des mutants *sax-7* ne surviennent qu'à partir du 4^e stade larvaire, soit après l'apparition des défauts de chevauchement des CEPsh (Desse et al., 2021). La position de neurones sensoriels a donc été mise en relation avec les CEPsh chez les mutants *sax-7*. Durant cet essai exploratoire, il a été possible d'observer que les neurones antérieurs au neuropile coïncidaient avec l'absence de chevauchement des cellules gliales, ce qui serait conséquent avec l'idée que les CEPsh pourraient servir à isoler le neuropile en constituant une barrière physique et/ou moléculaire. De plus, il est intéressant de constater que les expériences de perturbation des CEPsh avaient également menées à l'observation de ce type de défauts. Ces derniers étaient cependant moins importants en termes d'expressivité, puisqu'il ne s'agissait que d'une superposition d'un neurone plutôt que d'un dépassement antérieur au neuropile. Une amélioration de la technique *miniSOG* permettrait d'approfondir l'importance d'un recouvrement complet de l'anneau nerveux par les CEPsh pour maintenir l'intégrité structurelle des ganglions de la tête.

3.4.5 Perspectives

3.4.5.1 Valider la présence de SAX-7 dans les cellules gliales à l'âge adulte

Les seules données disponibles dans les bases de données en ligne concernant l'expression de *sax-7* dans les GLR et les CEPsh correspondaient au stade embryonnaire et au 2^e stade larvaire. Or, examiner si l'expression de SAX-7 dans les cellules gliales persiste à l'âge adulte donnerait une indication supplémentaire que cette molécule d'adhésion serait requise à la maintenance gliale. Des souches exprimant des rapporteurs traductionnels de SAX-7 sont déjà conservées au laboratoire et leur utilisation constituerait un moyen rapide et efficace de traiter cette question. Par exemple, des croisements de la souche *ddIs290* [SAX-7::EGFP] avec les souches marquant les GLR et CEPsh en rouge permettrait de faire une co-localisation des marqueurs pour analyser la localisation de SAX-7 dans ces cellules gliales. Sachant que c'est la perte de fonction de l'isoforme courte de SAX-7 qui est à l'origine des défauts de maintenance neuronale, l'utilisation d'une souche permettant de vérifier l'expression spécifique de cette isoforme, soit un *knock-in* de sfGFP::SAX-7C, pourrait éventuellement être considérée (Desse et al., 2021). Malheureusement,

dans cette souche, sfGFP::SAX-7C est située de manière artéfactuelle à la périphérie du noyau au lieu de la membrane plasmique des cellules (ceci est lié à une perturbation du site de clivage du peptide signal de SAX-7C), ne permettant pas d'en déterminer la localisation membranaire.

3.4.5.2 Effectuer des expériences de sauvetage des défauts gliaux

Ces travaux ayant mené à l'identification de plusieurs défauts morphologiques des cellules gliales, une étape future serait de rétablir l'architecture gliale au moyen d'expériences de sauvetage. D'abord, des lignées transgéniques exprimant la forme sauvage de SAX-7C sous le contrôle de son promoteur endogène pourraient être générées dans le but de déterminer si la réintroduction de l'isoforme courte est suffisante pour sauver les défauts, similairement à ce qui est observé pour les défauts de maintenance neuronaux (Sasakura et al., 2005; Pocock et al., 2008; Desse et al., 2021). L'analyse de mutants spécifiques à l'isoforme longue pourrait être utile pour confirmer que cette isoforme n'est pas impliquée dans l'apparition des défauts. Ensuite, l'expression de SAX-7 sous différents promoteurs permettraient de déterminer si son action est cellule autonome en utilisant les promoteurs spécifiques des GLR et CEPsh, cellule non-autonome en utilisant des promoteurs menant à une expression dans des tissus à proximité de ces cellules gliales (épiderme, neurones, muscles et pharynx) ou une combinaison des deux modes d'action en combinant plusieurs promoteurs.

3.4.5.3 Déterminer l'impact d'une déplétion post-développementale de SAX-7

Certains phénotypes observés chez les mutants *sax-7*, tels que la longueur des GLR et le chevauchement incomplet des CEPsh, nécessiteraient d'être davantage étudiés. Comme mentionné plus haut, le rapporteur utilisé pour visualiser les GLR à de plus jeunes stades n'est pas idéal et, bien que les défauts morphologiques des CEPsh soient développementaux, il se peut que SAX-7 soit tout de même requise tout au long de la vie du nématode pour maintenir l'adhésion entre les quatre cellules.

L'emploi de AID (*Auxin inductible degron*), une approche de dégradation protéique allouant un contrôle spatiotemporel, permettrait la dégradation post-développementale de SAX-7 dans les GLR et les CEPsh (Zhang et al., 2015). Brièvement, la méthode consiste à exprimer la protéine TIR1 (*Transport Inhibitor Response 1*) sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la cellule à l'étude et de fusionner la séquence AID à la protéine d'intérêt à dégrader. Lorsque l'auxine, une hormone végétale, est ajoutée sur les plaques où les vers se trouvent, la protéine TIR1

s'étant préalablement incorporée à un complexe ubiquitine ligase, va se lier à la protéine dégron et mener à l'ubiquitination puis dégradation de la protéine d'intérêt par le protéasome (Figure 28).

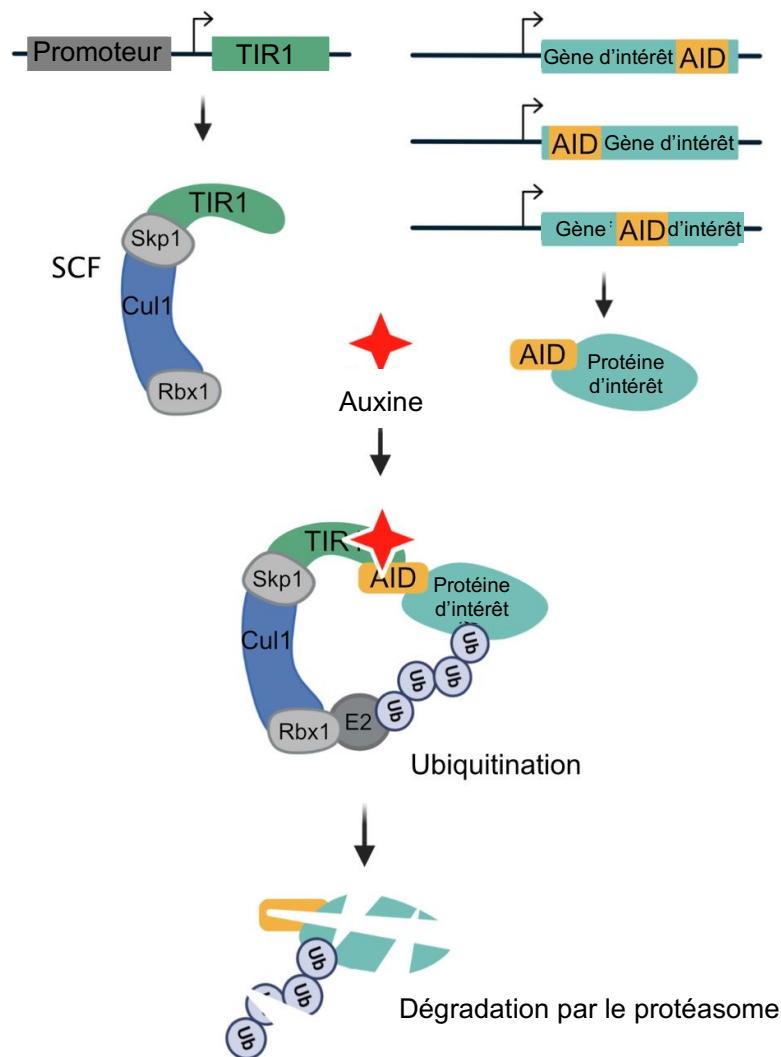


Figure 28. – Schématisation de l'approche Dégron inducible par l'auxine (AID). Image adaptée de Guinevere et al. (2021).

Enfin, une visualisation des neurones sensoriels chez des vers présentant une dégradation post-développementale de SAX-7 dans les GLR et les CEPsh permettrait de faire suite aux résultats préliminaires afin de déterminer si les altérations morphologiques des cellules gliales influencent l'apparition des défauts de maintenance neuronale. Cela servirait notamment à vérifier si 1) le positionnement des GLR est à l'origine du déplacement de l'anneau nerveux et 2) si le chevauchement incomplet des CEPsh diminue la fonction barrière de cette cellule autour du neuropile et mène à l'invasion de l'espace par les corps cellulaires des neurones.

CHAPITRE 4 – Discussion générale et conclusion

4.1 Récapitulatif des résultats

Comment l'architecture du système nerveux est protégée tout au long de la vie malgré des périodes de maturation, de croissance, de stress mécaniques (locomotion, respiration, digestion, accidents, etc.) et de vieillissement n'est pas encore bien compris. Des recherches avec *C. elegans* ont mené à l'identification de mécanismes de maintenance de ganglions et fascicules neuronaux impliquant des facteurs conservés appartenant en grande partie à la superfamille des immunoglobulines (Bénard and Hobert, 2009). Ces travaux de maîtrise ont permis d'approfondir le rôle de facteurs de l'environnement neuronal dans la maintenance du système nerveux.

Le premier axe concernait l'investigation des conséquences d'une perte de fonction du gène *mig-6*/Papiline sur la matrice extracellulaire pour supprimer des défauts de maintenance *sax-7*/L1CAM. MIG-6 possédant une structure protéique apparentée aux ADAMTS impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire, l'hypothèse de départ stipulait que MIG-6 puisse servir de modulateur de l'état de la matrice extracellulaire pour compenser la perte d'adhésion cellulaire induite chez les mutants *sax-7*. Un remodelage du collagène IV a effectivement été détecté chez les mutants *mig-6*. En effet, une augmentation de la quantité et un changement de la distribution du collagène IV au niveau du bulbe postérieur du pharynx, soit au niveau des structures neuronales désorganisées des mutants de maintenance, ont été observés. Une telle modification de l'état de la matrice extracellulaire chez les mutants *mig-6* a ensuite été investiguée en condition de stress mécanique pour tester la prédiction qu'elle puisse engendrer un phénotype neuronal. Les expériences de croissance en milieu liquide indiquent que la régulation du collagène IV suivant la perte de fonction de *mig-6* réduit l'apparition d'un déplacement neuronal relatif au bulbe postérieur du pharynx, appuyant à nouveau l'idée que l'état de la matrice extracellulaire joue un rôle dans la maintenance neuronale.

Le second axe de l'étude mettait de l'avant l'exploration des cellules gliales en contexte de maintenance du système nerveux, celles-ci étant en contact intime avec les structures neuronales et favorisant le fonctionnement du système nerveux dans son ensemble. Tant l'impact de deux types de cellules gliales, les GLR et les CEPsh, sur la maintenance neuronale que celui du facteur *sax-7* sur la maintenance gliale ont été examinés. L'instauration d'une approche d'optogénétique au laboratoire n'a pas permis de conclure de manière robuste sur l'effet d'une perturbation cellulaire des cellules gliales dans la maintenance neuronale. Un perfectionnement de la méthode

sera nécessaire pour y arriver. Par ailleurs, la génération de plusieurs outils génétiques ont permis de déterminer que la molécule d'adhésion SAX-7 était requise pour le développement de la morphologie des cellules gliales, et plus particulièrement pour la maintenance de la position des GLR, constituant des pistes intéressantes à poursuivre.

En somme, la recherche effectuée soutient l'implication de facteurs extrinsèques dans la protection à long terme du système nerveux. De futures expériences seront requises pour déterminer la possible interaction entre les facteurs de maintenance neuronaux, gliaux et de la matrice extracellulaire.

4.2 Perspectives : faire le pont entre les deux axes du projet

Ce projet s'intéresse aux rôles joués par des facteurs extrinsèques pour réguler la maintenance de l'architecture du système nerveux. Il est fort plausible qu'une interaction entre les facteurs explorés durant cette maîtrise existe. En effet, les cellules gliales sont connues pour sécréter des composants de la matrice extracellulaire chez les vertébrés étant impliqués dans plusieurs processus développementaux et post-développementaux (Wiese et al., 2012).

Chez *C. elegans*, il est connu que MIG-6 et le collagène IV sont tous les deux sécrétés par les GLR. Il pourrait être intéressant d'effectuer des expériences de sauvetage des défauts des ganglions neuronaux à partir des GLR et des muscles au moyen du promoteur *Pgly-18*, sachant que des expériences de sauvetage à partir des muscles ont mené à un sauvetage partiel des défauts de maintenance neuronale (Nadour et al., en préparation). Également, générer une lignée transgénique exprimant en opéron 1) un rapporteur transcriptionnel vert sous le contrôle de *Pmig-6* suivi de 2) un rapporteur traductionnel du collagène IV en rouge, ce qui serait pratique pour analyser la contribution des GLR à la sécrétion du collagène IV chez les mutants *mig-6(qv33)*. Enfin, une analyse de l'effet d'une perte de fonction de *mig-6* sur la suppression des défauts des cellules gliales serait intéressante à effectuer.

4.3 Retombées des travaux

4.3.1 Identification de mécanismes conservés chez l'humain

La découverte des processus de maintenance du système nerveux, en plus d'améliorer les connaissances fondamentales de la physiologie du nématode, pourrait mener à la compréhension de mécanismes conservés chez l'humain.

4.3.1.1 En contexte physiologique

L'implication de la matrice extracellulaire dans la préservation structurelle et fonctionnelle des organes a déjà été mentionnée plus haut. Il existe au niveau du système nerveux central des mammifères un type de matrice extracellulaire spécialisée nommé *perineuronal nets*, ou réseaux périneuronaux, étant constitués en grande partie par des protéoglycanes à chaînes chondroïtines sulfates (CSPG) et davantage présents autour des neurones inhibiteurs (Dansie and Ethell, 2011). Ces réseaux de protéines ont notamment été impliqués dans la régulation de la plasticité synaptique lors de la maturation du système nerveux, principalement durant les périodes critiques de consolidation des circuits (Dansie and Ethell, 2011). Chez le nématode, l'organisation de la matrice extracellulaire semble importante pour préserver les structures synaptiques, similairement aux réseaux périneuronaux (Kurshan et al., 2014). Les résultats en lien avec l'action de MIG-6 dans le remodelage du collagène IV soutiennent cette idée que l'organisation de l'environnement neuronal est importante pour la maintenance des structures, même à plus grande échelle. De plus, 24 *proteoglycan core proteins* ont été identifiées parmi lesquelles se trouve MIG-6, dont l'analyse *in silico* prédit un site d'attachement d'une chaîne chondroïtine sulfate (Noborn et al., 2018). Ces parallèles intéressants font en sorte que la recherche de mécanismes de maintenance neuronale chez le nématode aurait le potentiel de faciliter la compréhension du fonctionnement des réseaux périneuronaux.

Par ailleurs, une modification de la composition des membranes basales est détectée au niveau de la barrière hémato-encéphalique avec l'âge (Reed et al., 2019). Par exemple, une analyse post-mortem de tissus humains a révélé qu'un épaissement de la paroi de capillaires et qu'une accumulation de collagène IV à la membrane basale survenaient avec l'âge (Uspenskaia et al., 2004). Des résultats similaires d'augmentation de l'épaisseur, de la proportion de collagène IV et de la rigidité ont été obtenus à partir d'échantillons de membranes basales de rétines (Candiello et

al., 2010). De plus, une étude chez la souris âgée a révélé qu'une augmentation d'un inhibiteur de métalloprotéases améliorerait la plasticité synaptique dans l'hippocampe, révélant l'impact d'un remodelage de la matrice extracellulaire survenant avec l'âge (Castellano et al., 2017). Une défaillance des mécanismes de maintenance pourrait être impliquée dans le vieillissement de ces structures du système nerveux. Approfondir le rôle de maintenance de la matrice extracellulaire chez *C. elegans* pourrait aider à comprendre ces phénomènes observés lors du vieillissement.

4.3.1.2 En contexte pathologique

Outre entraîner un vieillissement du système nerveux, une réduction de l'efficacité des mécanismes de maintenance neuronale pourrait mener à l'apparition de conditions neuropathologiques ou entraîner des déficits à la suite d'atteintes internes ou externes. Quelques exemples faisant intervenir les cellules gliales et la matrice extracellulaire seront présentés.

D'abord, des études ont révélé que des accidents vasculaires cérébraux ischémiques induisaient une augmentation de déposition de collagène IV dans le parenchyme cérébral chez la souris, le rat, le mouton et l'humain (Hartig et al., 2017; Michalski et al., 2020). De plus, le collagène IV est entre autres sécrété par les astrocytes dans les cicatrices gliales, formées à la suite d'un traumatisme cérébral ou d'une lésion de la moelle épinière qui influencent la capacité régénérative axonale, soulignant l'importance d'approfondir l'interaction de ces deux facteurs dans la protection à long terme du système nerveux (Klapka and Muller, 2006; George and Geller, 2018). Par ailleurs, les résultats de plusieurs études indiquent que la fonction gliale influence grandement l'apparition de maladies neurodégénératives comme la sclérose latérale amyotrophique, la sclérose en plaques, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Huntington et la maladie de Parkinson et que les cicatrices fibro-gliales ont des conséquences dans certaines de ces maladies neurodégénératives (D'Ambrosi and Apolloni, 2020; Gleichman and Carmichael, 2020). Enfin, les travaux pourraient aider à comprendre les comportements cellulaires résultant d'un changement de composition de la matrice extracellulaire survenant dans des cancers comme le glioblastome et aider à restreindre la motilité des cellules cancéreuses exprimant des molécules d'adhésion comme L1CAM (Levental et al., 2009; Yang et al., 2009; Virga et al., 2019).

4.3.2 Potentiel thérapeutique

Comprendre comment l'action de facteurs extrinsèques incluant la matrice extracellulaire et les cellules gliales protègent à long terme l'architecture du système nerveux pourrait permettre d'améliorer les biomatériaux utilisés pour modéliser l'environnement neuronal (p.ex., dans des matrices synthétiques, organoïdes et organes sur puce) et être utile pour effectuer des analyses toxicologiques et d'essais pharmacologiques (Chaudhuri et al., 2020). Également, ces travaux pourraient éventuellement avoir des répercussions positives sur l'identification nouvelles cibles thérapeutiques, le remodelage de la matrice étant par exemple une avenue thérapeutique intéressante pour les maladies neurodégénératives (D'Ambrosi and Apolloni, 2020).

4.4 Conclusion

En conclusion, ces travaux de maîtrise ont permis d'approfondir la contribution de la matrice extracellulaire et de deux types de cellules gliales dans un contexte de maintenance de l'architecture du système nerveux chez *C. elegans*. Les résultats dévoilent que MIG-6/Papiline agit comme régulateur de l'organisation du collagène IV pour compenser les défauts d'adhésion cellulaire perçus chez les mutants de maintenance *sax-7/L1CAM* et pour contrer un déplacement des ganglions neuronaux lors d'un stress mécanique accru. L'exploration des GLR et des CEPsh a quant à elle permis de mettre en évidence comment ces cellules gliales étaient affectées chez les mutants de maintenance *sax-7/L1CAM*. De futures expériences permettront d'en dire plus sur leur interaction avec les neurones et la matrice extracellulaire pour maintenir l'assemblage initial des structures neuronales face aux défis que représentent la maturation, la croissance, les stress mécaniques et le vieillissement tout au long de la vie.

Références bibliographiques

- Adler CE, Fetter RD, Bargmann CI (2006) UNC-6/Netrin induces neuronal asymmetry and defines the site of axon formation. *Nat Neurosci* 9:511-518.
- Aida T, Yoshida J, Nomura M, Tanimura A, Iino Y, Soma M, Bai N, Ito Y, Cui W, Aizawa H, Yanagisawa M, Nagai T, Takata N, Tanaka KF, Takayanagi R, Kano M, Götz M, Hirase H, Tanaka K (2015) Astroglial Glutamate Transporter Deficiency Increases Synaptic Excitability and Leads to Pathological Repetitive Behaviors in Mice. *Neuropsychopharmacology* 40:1569-1579.
- Albertson DG, Thompson JN, Brenner S (1976) The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 275:299-325.
- Allen NJ, Lyons DA (2018) Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* 362:181.
- Altun ZF, Hall DH (2009) Muscle system, GLR cells. *WormAtlas*.
- Altun ZF, Herndon LA, Wolkow CA, Crocker C, Lints R, Hall DH (2002-2021) *WormAtlas*.
- Amran A, Pigatto L, Pocock R, Gopal S (2021) Functions of the extracellular matrix in development: Lessons from *Caenorhabditis elegans*. *Cell Signal*:110006.
- Aurelio O, Hall DH, Hobert O (2002) Immunoglobulin-domain proteins required for maintenance of ventral nerve cord organization. *Science* 295:686-690.
- Barnett ME, Baran TM, Foster TH, Wojtovich AP (2018) Quantification of light-induced miniSOG superoxide production using the selective marker, 2-hydroxyethidium. *Free radical biology & medicine* 116:134-140.
- Baumann N, Pham-Dinh D (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81:871-927.

- Béjot Y, Yaffe K (2019) Ageing Population: A Neurological Challenge. *Neuroepidemiology* 52:76-77.
- Bénard C, Tjoe N, Boulin T, Recio J, Hobert O (2009) The small , secreted immunoglobulin protein ZIG-3 maintains axon position in *Caenorhabditis elegans*.
- Bénard C, Hobert O (2009) Looking beyond development: maintaining nervous system architecture. *Curr Top Dev Biol* 87:175-194.
- Bénard CY, Boyanov A, Hall DH, Hobert O (2006) DIG-1, a novel giant protein, non-autonomously mediates maintenance of nervous system architecture. *Development* 133:3329-3340.
- Bénard CY, Blanchette C, Recio J, Hobert O (2012) The secreted immunoglobulin domain proteins ZIG-5 and ZIG-8 cooperate with L1CAM/SAX-7 to maintain nervous system integrity. *PLoS Genet* 8:e1002819.
- Bevilacqua C, Sánchez-Iranzo H, Richter D, Diz-Muñoz A, Prevedel R (2019) Imaging mechanical properties of sub-micron ECM in live zebrafish using Brillouin microscopy. *Biomed Opt Express* 10:1420-1431.
- Bhave G, Colon S, Ferrell N (2017) The sulfilimine cross-link of collagen IV contributes to kidney tubular basement membrane stiffness. *Am J Physiol Renal Physiol* 313:F596-f602.
- Bhave G, Cummings CF, Vanacore RM, Kumagai-Cresse C, Ero-Tolliver IA, Rafi M, Kang JS, Pedchenko V, Fessler LI, Fessler JH, Hudson BG (2012) Peroxidasin forms sulfilimine chemical bonds using hypohalous acids in tissue genesis. *Nat Chem Biol* 8:784-790.
- Blelloch R, Anna-Arriola SS, Gao D, Li Y, Hodgkin J, Kimble J (1999) The gon-1 Gene Is Required for Gonadal Morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 216:382-393.
- Bozorgmehr T, Ardiel E, McEwan A, Rankin C (2013) Mechanisms of plasticity in a *Caenorhabditis elegans* mechanosensory circuit. *Front Physiol* 4.
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71-94.

- Bülow H, Boulin T, Hobert O (2004) Differential functions of the *C. elegans* FGF receptor in axon outgrowth and maintenance of axon position.
- Byerly L, Cassada RC, Russell RL (1976) The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction. *Dev Biol* 51:23-33.
- C.-elegans-Sequencing-Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282:2012-2018.
- Candiello J, Cole GJ, Halfter W (2010) Age-dependent changes in the structure, composition and biophysical properties of a human basement membrane. *Matrix Biol* 29:402-410.
- Cassada RC, Russell RL (1975) The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 46:326-342.
- Castellano JM, Mosher KI, Abbey RJ, McBride AA, James ML, Berdnik D, Shen JC, Zou B, Xie XS, Tingle M, Hinkson IV, Angst MS, Wyss-Coray T (2017) Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. *Nature* 544:488-492.
- Celen I, Doh JH, Sabanayagam CR (2018) Effects of liquid cultivation on gene expression and phenotype of *C. elegans*. *BMC Genomics* 19:562.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.
- Chase DL, Koelle MR (2007) Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*. *WormBook*:1-15.
- Chaudhuri O, Cooper-White J, Janmey PA, Mooney DJ, Shenoy VB (2020) Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature* 584:535-546.
- Chen L, Zhou S (2010) "CRASH"ing with the worm: insights into L1CAM functions and mechanisms. *Dev Dyn* 239:1490-1501.
- Cherra SJ, Jin Y (2016) A Two-Immunoglobulin-Domain Transmembrane Protein Mediates an Epidermal-Neuronal Interaction to Maintain Synapse Density. *Neuron* 89:325-336.

- Clay MR, Sherwood DR (2015) Basement Membranes in the Worm: A Dynamic Scaffolding that Instructs Cellular Behaviors and Shapes Tissues. *Curr Top Membr* 76:337-371.
- Coakley S, Ritchie FK, Galbraith KM, Hilliard MA (2020) Epidermal control of axonal attachment via beta-spectrin and the GTPase-activating protein TBC-10 prevents axonal degeneration. *Nat Commun* 11:133.
- Cook SJ, Jarrell TA, Brittin CA, Wang Y, Bloniarz AE, Yakovlev MA, Nguyen KCQ, Tang LT, Bayer EA, Duerr JS, Bülow HE, Hobert O, Hall DH, Emmons SW (2019) Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature* 571:63-71.
- Corty MM, Freeman MR (2013) Cell biology in neuroscience: Architects in neural circuit design: glia control neuron numbers and connectivity. *J Cell Biol* 203:395-405.
- Culetto E, Sattelle DB (2000) A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum Mol Genet* 9:869-877.
- D'Ambrosi N, Apolloni S (2020) Fibrotic Scar in Neurodegenerative Diseases. *Front Immunol* 11:1394.
- Dansie LE, Ethell IM (2011) Casting a net on dendritic spines: the extracellular matrix and its receptors. *Dev Neurobiol* 71:956-981.
- Desse VE, Blanchette CR, Nadour M, Perrat P, Rivollet L, Khandekar A, Bénard CY (2021) Neuronal post-developmentally acting SAX-7S/L1CAM can function as cleaved fragments to maintain neuronal architecture in *C. elegans*. *Genetics*.
- Doh JH, Moore AB, Celen I, Moore MT, Sabanayagam CR (2016) ChIP and Chips: Introducing the WormPharm for correlative studies employing pharmacology and genome-wide analyses in *C. elegans*. *J Biol Methods* 3:e44.
- Duncan S, Delage S, Chioran A, Sirbu O, Brown TJ, Ringuette MJ (2020) The predicted collagen-binding domains of *Drosophila* SPARC are essential for survival and for collagen IV distribution and assembly into basement membranes. *Dev Biol* 461:197-209.

- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn A-M, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Etchberger JF, Flowers EB, Poole RJ, Bashllari E, Hobert O (2009) Cis-regulatory mechanisms of left/right asymmetric neuron-subtype specification in *C. elegans*. *Development* 136:147-160.
- Fan J, Ji T, Wang K, Huang J, Wang M, Manning L, Dong X, Shi Y, Zhang X, Shao Z, Colon-Ramos DA (2020) A muscle-epidermis-glia signaling axis sustains synaptic specificity during allometric growth in *Caenorhabditis elegans*. *Elife* 9.
- Fan L, Kovacevic I, Heiman MG, Bao Z (2019) A multicellular rosette-mediated collective dendrite extension. *eLife* 8:e38065.
- Fang-Yen C, Wyart M, Xie J, Kawai R, Kodger T, Chen S, Wen Q, Samuel AD (2010) Biomechanical analysis of gait adaptation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:20323-20328.
- Fessler JH, Kramerova I, Kramerov A, Chen Y, Fessler LI (2004) Papilin, a novel component of basement membranes, in relation to ADAMTS metalloproteases and ECM development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36:1079-1084.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Fouad AD, Teng S, Mark JR, Liu A, Alvarez-Illera P, Ji H, Du A, Bhirgoo PD, Cornblath E, Guan SA, Fang-Yen C (2018) Distributed rhythm generators underlie *Caenorhabditis elegans* forward locomotion. *Elife* 7.
- Frantz C, Stewart KM, Weaver VM (2010) The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 123:4195-4200.
- Fung W, Wexler L, Heiman MG (2020) Cell-type-specific promoters for *C. elegans* glia. *J Neurogenet* 34:335-346.

- Gengyo-Ando K, Kamiya Y, Yamakawa A, Kodaira K, Nishiwaki K, Miwa J, Hori I, Hosono R (1993) The *C. elegans* unc-18 gene encodes a protein expressed in motor neurons. *Neuron* 11:703-711.
- George N, Geller HM (2018) Extracellular matrix and traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 96:573-588.
- Gkretsi V, Stylianopoulos T (2018) Cell Adhesion and Matrix Stiffness: Coordinating Cancer Cell Invasion and Metastasis. *Front Oncol* 8.
- Gleichman AJ, Carmichael ST (2020) Glia in neurodegeneration: Drivers of disease or along for the ride? *Neurobiol Dis* 142:104957.
- Gotenstein JR, Koo CC, Ho TW, Chisholm AD (2018) Genetic Suppression of Basement Membrane Defects in *Caenorhabditis elegans* by Gain of Function in Extracellular Matrix and Cell-Matrix Attachment Genes. *Genetics* 208:1499.
- Gotenstein JR, Swale RE, Fukuda T, Wu Z, Giurumescu CA, Goncharov A, Jin Y, Chisholm AD (2010) The *C. elegans* peroxidase PXN-2 is essential for embryonic morphogenesis and inhibits adult axon regeneration. *Development* 137:3603-3613.
- Graham PL, Johnson JJ, Wang S, Sibley MH, Gupta MC, Kramer JM (1997) Type IV collagen is detectable in most, but not all, basement membranes of *Caenorhabditis elegans* and assembles on tissues that do not express it. *J Cell Biol* 137:1171-1183.
- Guo M, Wu T-H, Song Y-X, Ge M-H, Su C-M, Niu W-P, Li L-L, Xu Z-J, Ge C-L, Al-Mhanawi MTH, Wu S-P, Wu Z-X (2015) Reciprocal inhibition between sensory ASH and ASI neurons modulates nociception and avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications* 6:5655.
- Haase G, Gavert N, Brabletz T, Ben-Ze'ev A (2017) A point mutation in the extracellular domain of L1 blocks its capacity to confer metastasis in colon cancer cells via CD10. *Oncogene* 36:1597-1606.

- Haigo SL, Bilder D (2011) Global Tissue Revolutions in a Morphogenetic Movement Controlling Elongation. *Science* 331:1071.
- Hammarlund M, Hobert O, Miller DM, Sestan N (2018) The CeNGEN Project: The Complete Gene Expression Map of an Entire Nervous System. *Neuron* 99:430-433.
- Hartig W, Mages B, Aleithe S, Nitzsche B, Altmann S, Barthel H, Krueger M, Michalski D (2017) Damaged Neocortical Perineuronal Nets Due to Experimental Focal Cerebral Ischemia in Mice, Rats and Sheep. *Front Integr Neurosci* 11:15.
- Heckman EL, Doe CQ (2021) Establishment and Maintenance of Neural Circuit Architecture. *J Neurosci* 41:1119-1129.
- Hedgecock EM, Sulston JE, Thomson JN (1983) Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 220:1277-1279.
- Hedgecock EM, Culotti JG, Thomson JN, Perkins LA (1985) Axonal guidance mutants of *Caenorhabditis elegans* identified by filling sensory neurons with fluorescein dyes. *Dev Biol* 111:158-170.
- Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH, Stern BD (1987) Genetics of cell and axon migrations in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 100:365-382.
- Heiman MG, Shaham S (2009) DEX-1 and DYF-7 establish sensory dendrite length by anchoring dendritic tips during cell migration. *Cell* 137:344-355.
- Hesselson D, Newman C, Kim KW, Kimble J (2004) GON-1 and Fibulin Have Antagonistic Roles in Control of Organ Shape. *Curr Biol* 14:2005-2010.
- Hipp MS, Kasturi P, Hartl FU (2019) The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20:421-435.
- Hobert O, Kratsios P (2019) Neuronal identity control by terminal selectors in worms, flies, and chordates. *Curr Opin Neurobiol* 56:97-105.

- Hodgkin J, Horvitz HR, Brenner S (1979) Nondisjunction Mutants of the Nematode CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics* 91:67-94.
- Hortsch M, Nagaraj K, Mualla R (2014) The L1 family of cell adhesion molecules: a sickening number of mutations and protein functions. *Adv Neurobiol* 8:195-229.
- Hsu JM, Chen CH, Chen YC, McDonald KL, Gurling M, Lee A, Garriga G, Pan CL (2014) Genetic analysis of a novel tubulin mutation that redirects synaptic vesicle targeting and causes neurite degeneration in *C. elegans*. *PLoS Genet* 10:e1004715.
- Hu PJ (2007) Dauer. *WormBook : the online review of C elegans biology*:1-19.
- Hua JY, Smith SJ (2004) Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nat Neurosci* 7:327-332.
- Hutter H, Ng M-P, Chen N (2009) GExplore: a web server for integrated queries of protein domains, gene expression and mutant phenotypes. *BMC Genomics* 10:529.
- Ihara S, Nishiwaki K (2007) Prodomain-dependent tissue targeting of an ADAMTS protease controls cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO Journal* 26:2607-2620.
- Jafari G, Burghoorn J, Kawano T, Mathew M, Morck C, Axang C, Ailion M, Thomas JH, Culotti JG, Swoboda P, Pilon M (2010) Genetics of extracellular matrix remodeling during organ growth using the *Caenorhabditis elegans* pharynx model. *Genetics* 186:969-982.
- Jayadev R, Sherwood DR (2017) Basement membranes. *Curr Biol* 27:R207-R211.
- Jayadev R, Chi Q, Keeley DP, Hastie EL, Kelley LC, Sherwood DR (2019) alpha-Integrins dictate distinct modes of type IV collagen recruitment to basement membranes. *J Cell Biol* 218:3098-3116.
- Jorba I, Uriarte JJ, Campillo N, Farré R, Navajas D (2017) Probing Micromechanical Properties of the Extracellular Matrix of Soft Tissues by Atomic Force Microscopy. *J Cell Physiol* 232:19-26.

- Kaletta T, Hengartner MO (2006) Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov* 5:387-398.
- Katz M, Corson F, Iwanir S, Biron D, Shaham S (2018) Glia Modulate a Neuronal Circuit for Locomotion Suppression during Sleep in *C. elegans*. *Cell Rep* 22:2575-2583.
- Katz M, Corson F, Keil W, Singhal A, Bae A, Lu Y, Liang Y, Shaham S (2019) Glutamate spillover in *C. elegans* triggers repetitive behavior through presynaptic activation of MGL-2/mGluR5. *Nat Commun* 10:1882.
- Kawano T, Zheng H, Merz DC, Kohara Y, Tamai KK, Nishiwaki K, Culotti JG (2009) *C. elegans* mig-6 encodes papilin isoforms that affect distinct aspects of DTC migration, and interacts genetically with mig-17 and collagen IV. *Development* 136:1433-1442.
- Keeley DP, Hastie E, Jayadev R, Kelley LC, Chi Q, Payne SG, Jeger JL, Hoffman BD, Sherwood DR (2020) Comprehensive Endogenous Tagging of Basement Membrane Components Reveals Dynamic Movement within the Matrix Scaffolding. *Dev Cell* 54:60-74.e67.
- Khalilgharibi N, Mao Y (2021) To form and function: on the role of basement membrane mechanics in tissue development, homeostasis and disease. *Open Biology* 11:200360.
- Kimble J, Hirsh D (1979) The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 70:396-417.
- Klapka N, Muller HW (2006) Collagen matrix in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 23:422-435.
- Kolata S, Wu J, Light K, Schachner M, Matzel LD (2008) Impaired working memory duration but normal learning abilities found in mice that are conditionally deficient in the close homolog of L1. *J Neurosci* 28:13505-13510.
- Korta J, Clark DA, Gabel CV, Mahadevan L, Samuel AD (2007) Mechanosensation and mechanical load modulate the locomotory gait of swimming *C. elegans*. *J Exp Biol* 210:2383-2389.

- Kramerova IA, Kawaguchi N, Fessler LI, Nelson RE, Chen Y, Kramerov AA, Kusche-Gullberg M, Kramer JM, Ackley BD, Sieron AL, Prockop DJ, Fessler JH (2000) Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases. *Development* 127:5475-5485.
- Krishnaswamy VR, Benbenishty A, Blinder P, Sagi I (2019) Demystifying the extracellular matrix and its proteolytic remodeling in the brain: structural and functional insights. *Cell Mol Life Sci* 76:3229-3248.
- Kubota Y, Nagata K, Sugimoto A, Nishiwaki K (2012) Tissue Architecture in the *Caenorhabditis elegans* Gonad Depends on Interactions Among Fibulin-1, Type IV Collagen and the ADAMTS Extracellular Protease. *Genetics* 190:1379-1388.
- Kurshan PT, Phan AQ, Wang GJ, Crane MM, Lu H, Shen K (2014) Regulation of synaptic extracellular matrix composition is critical for proper synapse morphology. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:12678-12689.
- Laranjeiro R, Harinath G, Burke D, Braeckman BP, Driscoll M (2017) Single swim sessions in *C. elegans* induce key features of mammalian exercise. *BMC Biol* 15:30.
- Laranjeiro R, Harinath G, Hewitt JE, Hartman JH, Royal MA, Meyer JN, Vanapalli SA, Driscoll M (2019) Swim exercise in *Caenorhabditis elegans* extends neuromuscular and gut healthspan, enhances learning ability, and protects against neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:23829-23839.
- Leinwand SG, Chalasani SH (2013) Neuropeptide signaling remodels chemosensory circuit composition in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Neurosci* 16:1461-1467.
- Lev I, Bril R, Liu Y, Cere LI, Rechavi O (2019) Inter-generational consequences for growing *Caenorhabditis elegans* in liquid. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 374:20180125.
- Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SF, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W, Yamauchi M, Gasser DL, Weaver VM (2009) Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139:891-906.

- Leyva-Diaz E, Hobert O (2019) Transcription factor autoregulation is required for acquisition and maintenance of neuronal identity. *Development* 146.
- Liu Q, Kidd PB, Dobosiewicz M, Bargmann CI (2018) *C. elegans* AWA Olfactory Neurons Fire Calcium-Mediated All-or-None Action Potentials. *Cell* 175:57-70.e17.
- Luo S, Schaefer AM, Dour S, Nonet ML (2014) The conserved LIM domain-containing focal adhesion protein ZYX-1 regulates synapse maintenance in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 141:3922-3933.
- Margueritat J, Virgone-Carlotta A, Monnier S, Delanoë-Ayari H, Mertani HC, Berthelot A, Martinet Q, Dagany X, Rivière C, Rieu J-P, Dehoux T (2019) High-Frequency Mechanical Properties of Tumors Measured by Brillouin Light Scattering. *Phys Rev Lett* 122:018101.
- Mariol MC, Walter L, Bellemin S, Gieseler K (2013) A rapid protocol for integrating extrachromosomal arrays with high transmission rate into the *C. elegans* genome. *J Vis Exp*:e50773.
- McCloskey RJ, Fouad AD, Churgin MA, Fang-Yen C (2017) Food responsiveness regulates episodic behavioral states in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurophysiol* 117:1911-1934.
- McIntire SL, Jorgensen E, Kaplan J, Horvitz HR (1993) The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 364:337-341.
- Melentijevic I, Toth ML, Arnold ML, Guasp RJ, Harinath G, Nguyen KC, Taub D, Parker JA, Neri C, Gabel CV, Hall DH, Driscoll M (2017) *C. elegans* neurons jettison protein aggregates and mitochondria under neurotoxic stress. *Nature* 542:367-371.
- Mello C, Fire A (1995) DNA transformation. *Methods Cell Biol* 48:451-482.
- Meng L, Zhang A, Jin Y, Yan D (2016) Regulation of neuronal axon specification by glia-neuron gap junctions in *C. elegans*. *Elife* 5.
- Michalski D, Spielvogel E, Puchta J, Reimann W, Barthel H, Nitzsche B, Mages B, Jager C, Martens H, Horn AKE, Schob S, Hartig W (2020) Increased Immunosignals of Collagen

- IV and Fibronectin Indicate Ischemic Consequences for the Neurovascular Matrix Adhesion Zone in Various Animal Models and Human Stroke Tissue. *Front Physiol* 11:575598.
- Mohan V, Sullivan CS, Guo J, Wade SD, Majumder S, Agarwal A, Anton ES, Temple BS, Maness PF (2018) Temporal Regulation of Dendritic Spines Through NrCAM-Semaphorin3F Receptor Signaling in Developing Cortical Pyramidal Neurons. *Cereb Cortex* 29:963-977.
- Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Terreros-Roncal J, Rábano A, Cafini F, Pallas-Bazarra N, Ávila J, Llorens-Martín M (2019) Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med* 25:554-560.
- Morrissey MA, Jayadev R, Miley GR, Blebea CA, Chi Q, Ihara S, Sherwood DR (2016) SPARC Promotes Cell Invasion In Vivo by Decreasing Type IV Collagen Levels in the Basement Membrane. *PLoS Genet* 12:e1005905.
- Muriel JM, Dong C, Hutter H, Vogel BE (2005) Fibulin-1C and Fibulin-1D splice variants have distinct functions and assemble in a hemicentin-dependent manner. *Development* 132:4223-4234.
- Nadour M, Biard M, St-Louis P, Rivollet L, Thackeray A, Bénard C (en préparation) MIG-6/Papilin mediates the long-term maintenance of neuronal architecture by regulating the extracellular matrix.
- Nam S, Lee J, Brownfield Doug G, Chaudhuri O (2016) Viscoplasticity Enables Mechanical Remodeling of Matrix by Cells. *Biophys J* 111:2296-2308.
- Nguyen PT, Dorman LC, Pan S, Vainchtein ID, Han RT, Nakao-Inoue H, Taloma SE, Barron JJ, Molofsky AB, Kheirbek MA, Molofsky AV (2020) Microglial Remodeling of the Extracellular Matrix Promotes Synapse Plasticity. *Cell* 182:388-403 e315.
- Nicholson C, Sykova E (1998) Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci* 21:207-215.

- Nigon VM, Félix MA (2017) History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. *WormBook* 2017:1-84.
- Noblett N, Wu Z, Ding ZH, Park S, Roenspies T, Flibotte S, Chisholm AD, Jin Y, Colavita A (2019) DIP-2 suppresses ectopic neurite sprouting and axonal regeneration in mature neurons. *J Cell Biol* 218:125-133.
- Noborn F, Gomez Toledo A, Nasir W, Nilsson J, Dierker T, Kjellén L, Larson G (2018) Expanding the chondroitin glycoproteome of *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 293:379-389.
- Norman KR, Moerman DG (2000) The *let-268* locus of *Caenorhabditis elegans* encodes a procollagen lysyl hydroxylase that is essential for type IV collagen secretion. *Dev Biol* 227:690-705.
- Oikonomou G, Shaham S (2011) The glia of *Caenorhabditis elegans*. *Glia* 59:1253-1263.
- Packer JS, Zhu Q, Huynh C, Sivaramakrishnan P, Preston E, Dueck H, Stefanik D, Tan K, Trapnell C, Kim J, Waterston RH, Murray JI (2019) A lineage-resolved molecular atlas of *C. elegans* embryogenesis at single-cell resolution. *Science*:eaax1971.
- Park YK, Goda Y (2016) Integrins in synapse regulation. *Nat Rev Neurosci* 17:745-756.
- Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, Reinhart-King CA, Margulies SS, Dembo M, Boettiger D, Hammer DA, Weaver VM (2005) Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8:241-254.
- Pereira L, Kratsios P, Serrano-Saiz E, Sheftel H, Mayo AE, Hall DH, White JG, LeBoeuf B, Garcia LR, Alon U, Hobert O (2015) A cellular and regulatory map of the cholinergic nervous system of *C. elegans*. *eLife* 4:e12432.
- Perez-Cruz C, Simon M, Flügge G, Fuchs E, Czéh B (2009) Diurnal rhythm and stress regulate dendritic architecture and spine density of pyramidal neurons in the rat infralimbic cortex. *Behav Brain Res* 205:406-413.

- Pocock R, Bénard CY, Shapiro L, Hobert O (2008) Functional dissection of the *C. elegans* cell adhesion molecule SAX-7, a homologue of human L1. *Mol Cell Neurosci* 37:56-68.
- Poon VY, Klassen MP, Shen K (2008) UNC-6/netrin and its receptor UNC-5 locally exclude presynaptic components from dendrites. *Nature* 455:669-673.
- Pöschl E, Schlötzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U (2004) Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131:1619-1628.
- Pottgiesser J, Maurer P, Mayer U, Nischt R, Mann K, Timpl R, Krieg T, Engel J (1994) Changes in Calcium and Collagen IV Binding Caused by Mutations in the EF Hand and Other Domains of Extracellular Matrix Protein BM-40 (SPARC, Osteonectin). *J Mol Biol* 238:563-574.
- Prevedel R, Diz-Muñoz A, Ruocco G, Antonacci G (2019) Brillouin microscopy: an emerging tool for mechanobiology. *Nature Methods* 16:969-977.
- Prinz M, Jung S, Priller J (2019) Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell* 179:292-311.
- Qi Y, Xu S (2013) MiniSOG-mediated Photoablation in *Caenorhabditis elegans*. *Bio Protoc* 3.
- Qi YB, Garren EJ, Shu X, Tsien RY, Jin Y (2012) Photo-inducible cell ablation in *Caenorhabditis elegans* using the genetically encoded singlet oxygen generating protein miniSOG. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:7499-7504.
- Raiders S, Black EC, Bae A, MacFarlane S, Klein M, Shaham S, Singhvi A (2021) Glia actively sculpt sensory neurons by controlled phagocytosis to tune animal behavior. *Elife* 10.
- Ramirez-Suarez NJ, Belalcazar HM, Salazar CJ, Beyaz B, Raja B, Nguyen KCQ, Celestrin K, Fredens J, Faergeman NJ, Hall DH, Bulow HE (2019) Axon-Dependent Patterning and Maintenance of Somatosensory Dendritic Arbors. *Dev Cell* 48:229-244 e224.

- Rapti G (2020) A perspective on *C. elegans* neurodevelopment: from early visionaries to a booming neuroscience research. *J Neurogenet* 34:259-272.
- Rapti G, Li C, Shan A, Lu Y, Shaham S (2017) Glia initiate brain assembly through noncanonical Chimaerin-Furin axon guidance in *C. elegans*. *Nat Neurosci* 20:1350-1360.
- Reed MJ, Damodarasamy M, Banks WA (2019) The extracellular matrix of the blood-brain barrier: structural and functional roles in health, aging, and Alzheimer's disease. *Tissue Barriers* 7:1651157.
- Reh RK, Dias BG, Nelson CA, Kaufer D, Werker JF, Kolb B, Levine JD, Hensch TK (2020) Critical period regulation across multiple timescales. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117:23242.
- Richmond JE, Davis WS, Jorgensen EM (1999) UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans*. *Nat Neurosci* 2:959-964.
- Sanes DH, Reh TA, Harris WA, Landgraf M (2019) *Development of the nervous system*, 4th Edition. San Diego, Calif.: Academic Press.
- Sasakura H, Inada H, Kuhara A, Fusaoka E, Takemoto D, Takeuchi K, Mori I (2005) Maintenance of neuronal positions in organized ganglia by SAX-7, a *Caenorhabditis elegans* homologue of L1. *EMBO J* 24:1477-1488.
- Serrano-Saiz E, Leyva-Diaz E, De La Cruz E, Hobert O (2018) BRN3-type POU Homeobox Genes Maintain the Identity of Mature Postmitotic Neurons in Nematodes and Mice. *Curr Biol* 28:2813-2823 e2812.
- Serrano-Saiz E, Poole RJ, Felton T, Zhang F, De La Cruz ED, Hobert O (2013) Modular control of glutamatergic neuronal identity in *C. elegans* by distinct homeodomain proteins. *Cell* 155:659-673.
- Shah PK, Santella A, Jacobo A, Siletti K, Hudspeth AJ, Bao Z (2017) An In Toto Approach to Dissecting Cellular Interactions in Complex Tissues. *Dev Cell* 43:530-540 e534.

- Shao Z, Watanabe S, Christensen R, Jorgensen EM, Colon-Ramos DA (2013) Synapse location during growth depends on glia location. *Cell* 154:337-350.
- Shaye DD, Greenwald I (2011) OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLoS One* 6:e20085.
- Singhvi A, Shaham S (2019) Glia-Neuron Interactions in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Neurosci* 42:149-168.
- Singhvi A, Liu B, Friedman CJ, Fong J, Lu Y, Huang XY, Shaham S (2016) A Glial K/Cl Transporter Controls Neuronal Receptive Ending Shape by Chloride Inhibition of an rGC. *Cell* 165:936-948.
- Stevenson R, Samokhina E, Rossetti I, Morley JW, Buskila Y (2020) Neuromodulation of Glial Function During Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 14.
- Stiernagle T (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*:1-11.
- Sulston JE, Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56:110-156.
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100:64-119.
- Szu-Yu Ho T, Rasband MN (2011) Maintenance of neuronal polarity. *Dev Neurobiol* 71:474-482.
- Tailby C, Wright LL, Metha AB, Calford MB (2005) Activity-dependent maintenance and growth of dendrites in adult cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4631.
- Tau GZ, Peterson BS (2010) Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 35:147-168.
- Teuscher AC, Jongsma E, Davis MN, Statzer C, Gebauer JM, Naba A, Ewald CY (2019) The in-silico characterization of the *Caenorhabditis elegans* matrisome and proposal of a novel collagen classification. *Matrix Biol Plus* 1:100001.

- Thion MS, Garel S (2017) On place and time: microglia in embryonic and perinatal brain development. *Curr Opin Neurobiol* 47:121-130.
- Thompson O et al. (2013) The million mutation project: A new approach to genetics in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res* 23:1749-1762.
- Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kühn K (1981) A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem* 120:203-211.
- Toga AW, Thompson PM, Sowell ER (2006) Mapping brain maturation. *Trends Neurosci* 29:148-159.
- Topp KS, Boyd BS (2006) Structure and Biomechanics of Peripheral Nerves: Nerve Responses to Physical Stresses and Implications for Physical Therapist Practice. *Phys Ther* 86:92-109.
- Uspenskaia O, Liebetrau M, Herms J, Danek A, Hamann GF (2004) Aging is associated with increased collagen type IV accumulation in the basal lamina of human cerebral microvessels. *BMC Neurosci* 5:37.
- Van Essen DC (2020) A 2020 view of tension-based cortical morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117:32868.
- Vanacore R, Ham A-JL, Voehler M, Sanders CR, Conrads TP, Veenstra TD, Sharpless KB, Dawson PE, Hudson BG (2009) A Sulfilimine Bond Identified in Collagen IV. *Science* 325:1230.
- Varshney LR, Chen BL, Paniagua E, Hall DH, Chklovskii DB (2011) Structural properties of the *Caenorhabditis elegans* neuronal network. *PLoS Comput Biol* 7:e1001066.
- Vidal-Gadea AG, Davis S, Becker L, Pierce-Shimomura JT (2012) Coordination of behavioral hierarchies during environmental transitions in *Caenorhabditis elegans*. *Worm* 1:5-11.

- Virga J, Szivos L, Hortobagyi T, Chalsaraei MK, Zahuczky G, Steiner L, Toth J, Remenyi-Puskar J, Bogнар L, Klekner A (2019) Extracellular matrix differences in glioblastoma patients with different prognoses. *Oncol Lett* 17:797-806.
- Vogel BE, Hedgecock EM (2001) Hemicentin, a conserved extracellular member of the immunoglobulin superfamily, organizes epithelial and other cell attachments into oriented line-shaped junctions. *Development* 128:883-894.
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S (2002) Chronic Stress Induces Contrasting Patterns of Dendritic Remodeling in Hippocampal and Amygdaloid Neurons. *The Journal of Neuroscience* 22:6810.
- Wang X, Kweon J, Larson S, Chen L (2005) A role for the *C. elegans* L1CAM homologue *lad-1/sax-7* in maintaining tissue attachment. *Dev Biol* 284:273-291.
- Weller S, Gartner J (2001) Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): Mutations in the L1CAM gene. *Hum Mutat* 18:1-12.
- White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S (1983) Factors that determine connectivity in the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 48 Pt 2:633-640.
- White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S (1986) The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 314:1-340.
- Wiese S, Karus M, Faissner A (2012) Astrocytes as a source for extracellular matrix molecules and cytokines. *Front Pharmacol* 3:120.
- Witvliet D, Mulcahy B, Mitchell JK, Meirovitch Y, Berger DR, Wu Y, Liu Y, Koh WX, Parvathala R, Holmyard D, Schalek RL, Shavit N, Chisholm AD, Lichtman JW, Samuel ADT, Zhen M (2021) Connectomes across development reveal principles of brain maturation. [bioRxiv:2020.2004.2030.066209](https://doi.org/10.1101/2020.2004.2030.066209).
- Xu S, Chisholm AD (2016) Highly efficient optogenetic cell ablation in *C. elegans* using membrane-targeted miniSOG. *Sci Rep* 6:21271.

- Xu T, Huo J, Shao S, Po M, Kawano T, Lu Y, Wu M, Zhen M, Wen Q (2018) Descending pathway facilitates undulatory wave propagation in *Caenorhabditis elegans* through gap junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115:E4493.
- Yamada K, Hirotsu T, Matsuki M, Butcher RA, Tomioka M, Ishihara T, Clardy J, Kunitomo H, Iino Y (2010) Olfactory plasticity is regulated by pheromonal signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, NY)* 329:1647-1650.
- Yang M, Adla S, Temburni MK, Patel VP, Lagow EL, Brady OA, Tian J, Boulos MI, Galileo DS (2009) Stimulation of glioma cell motility by expression, proteolysis, and release of the L1 neural cell recognition molecule. *Cancer Cell Int* 9:27.
- Yang WK, Chien CT (2019) Beyond being innervated: the epidermis actively shapes sensory dendritic patterning. *Open Biol* 9:180257.
- Yemini E, Lin A, Nejatbakhsh A, Varol E, Sun R, Mena GE, Samuel ADT, Paninski L, Venkatachalam V, Hobert O (2021) NeuroPAL: A Multicolor Atlas for Whole-Brain Neuronal Identification in *C. elegans*. *Cell* 184:272-288.e211.
- Yoshimura S, Murray JI, Lu Y, Waterston RH, 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.
- Yurchenco PD, Ruben GC (1987) Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *J Cell Biol* 105:2559-2568.
- Zhang L, Ward JD, Cheng Z, Dernburg AF (2015) The auxin-inducible degradation (AID) system enables versatile conditional protein depletion in *C. elegans*. *Development* 142:4374-4384.
- Zonta B, Desmazieres A, Rinaldi A, Tait S, Sherman DL, Nolan MF, Brophy PJ (2011) A critical role for Neurofascin in regulating action potential initiation through maintenance of the axon initial segment. *Neuron* 69:945-956.
- Zuchero JB, Barres BA (2015) Glia in mammalian development and disease. *Development* 142:3805-3809.

CHAPITRE 5 - Annexes

5.1 Autres méthodes de quantification des structures fibrotiques

Pour quantifier l'état de la matrice extracellulaire, nous avons essayé différentes méthodes (voir les méthodes Critères et Seuil ci-dessous) en utilisant FIJI. Finalement, nous avons décidé de ne pas utiliser ces méthodes après avoir soumis deux autres membres du laboratoire à un test en aveugle.

Il s'est avéré que la méthode des critères (Figure 29) n'augmentait pas de manière significative l'objectivité de la quantification puisque la personne effectuant l'analyse devait toujours choisir les structures à mesurer. Elle ne permettait pas non plus de dénombrer avec précision les structures de type fibrotique, car une ligne droite ne peut rendre compte de la variabilité de leur forme et leur traçage à la main augmenterait la subjectivité.

La méthode du seuil (Figure 30) semblait prometteuse car la détection des structures était presque entièrement exécutée à l'aide de la fonction *Analyse particles*, mais elle présentait plusieurs limites. Premièrement, un cercle a été utilisé pour délimiter la zone sur laquelle effectuer l'analyse. Pour exclure la détection de petites accumulations circulaires ou du contour du bulbe terminal, nous avons fixé l'intervalle des tailles détectables entre 6 et 50 μm^2 . Néanmoins, le contour du pharynx a parfois été compté à tort puisque sa fluorescence variait d'une souche à l'autre, augmentant ainsi les faux positifs (Figure 31C). La délimitation de la zone avec un cercle plus petit que le bulbe terminal n'a pas résolu ce problème, car l'algorithme comptait alors le contour du bulbe terminal lorsqu'il était très intense, et il ne détectait pas les structures s'étendant au-delà du pharynx. Deuxièmement, après que deux autres membres du laboratoire ne travaillant pas sur ce projet et ne connaissant pas les structures aient été testés à l'aveugle pour quantifier les structures fibrotiques sur les images non modifiées et après application d'un seuil, les résultats ont confirmé que la méthode ne détectait pas avec précision les structures fibrotiques (Figure 31).

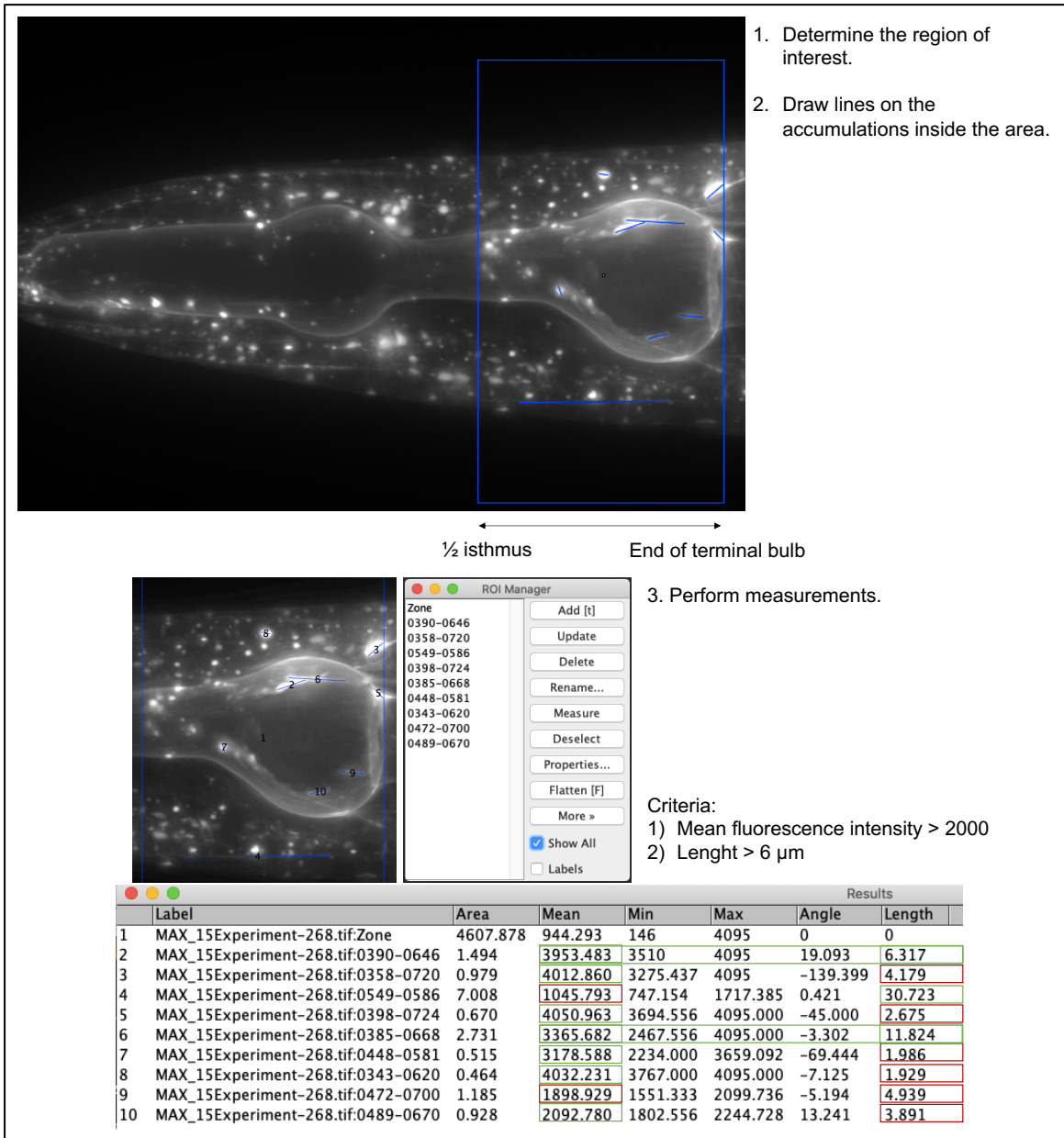


Figure 29. – Description de la méthode des critères.

1. Measure the width of the terminal bulb.

2. Calculate 125 % of this measurement.

3. Go to *Analyze > Tools > ROI manager > More » > Specify...*

4. Indicate the measurement in the boxes *width* and *height*.

5. Center the ROI on the terminal bulb.

6. Adjust the lower threshold to 1470 and the upper threshold to 65535.

7. Perform the particle analysis (6 – 50 μm^2) on the area determined in the previous steps.

Figure 30. – Description de la méthode des seuils.

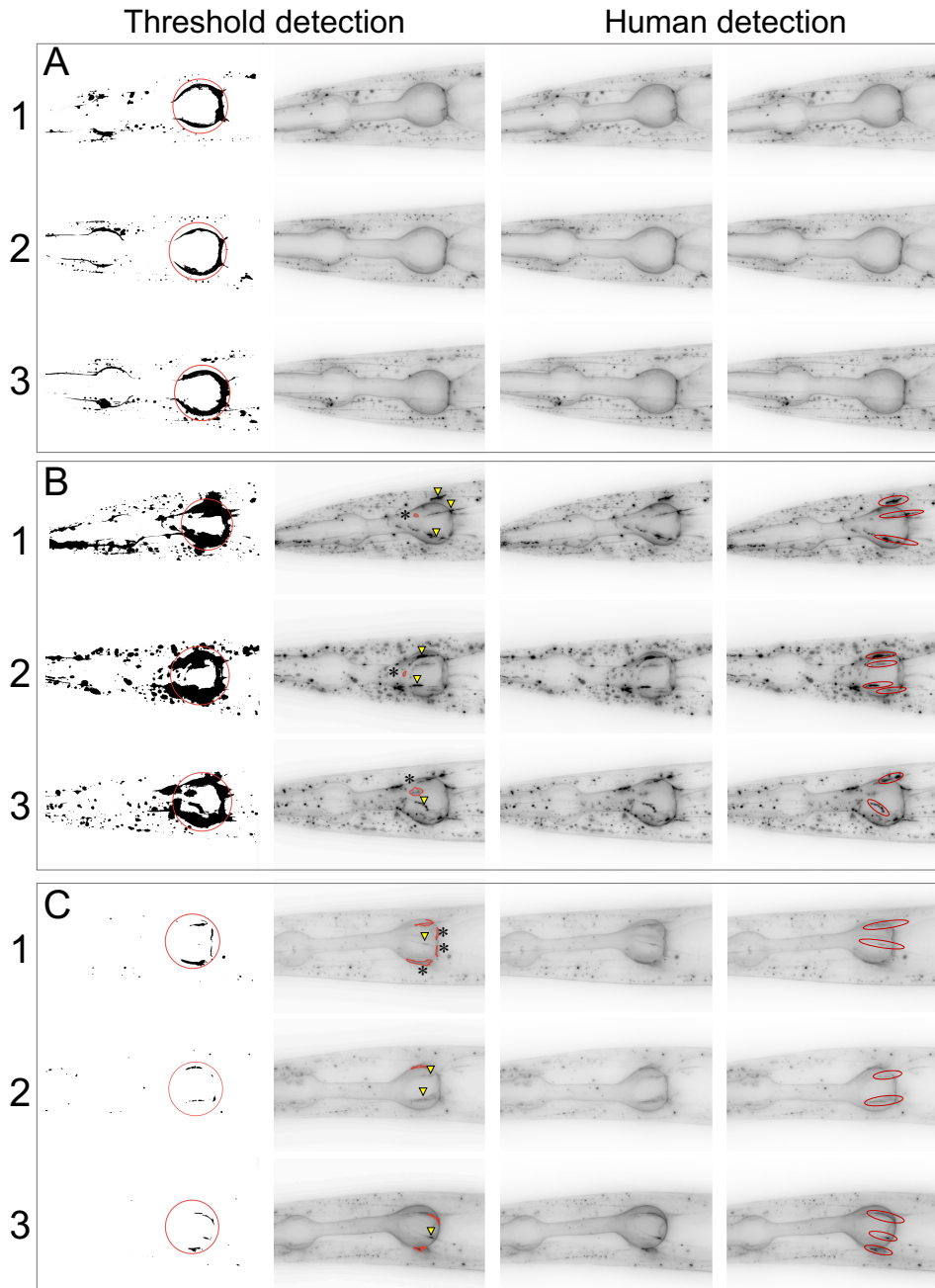


Figure 31. – Comparaison de la méthode du seuil avec la détection humaine de structures fibrotiques. Trois exemples de vers sont présentés par génotype : Type sauvage (A), *mig-6(qv33)* (B) et *mig-17(k174)* (C). Le collagène IV a été visualisé en utilisant le rapporteur fluorescent *qyls46*. Dans la première colonne, les cercles rouges délimitent la zone de détection. Dans la deuxième colonne, les structures détectées à l'aide de l'analyse des particules sont indiquées en rouge. Dans la quatrième colonne, les structures identifiées à la main sont indiquées par des ovales rouges. Les flèches jaunes indiquent les structures manquées par la méthode du seuil et les astérisques noirs indiquent les structures détectées à tort.

5.2 Essai de l'approche *miniSOG* en utilisant le microscope à fluorescence *Imager M2* comme source lumineuse

Tableau 8. – Tentatives de perturbations des CEPsh avec le microscope à fluorescence *Imager M2* comme source lumineuse.

Souche	Longueur d'onde (nm)	Irradiance (mW)	Durée (min)	Fréquence (Hz)	Résultat
VQ1769	475	2	2	2	Échec
VQ1769	475	57	5	2	Échec
VQ1769	475	57	30	2	Échec
VQ1769	475	57	30	Continue	Échec
VQ1769	430	57	5	2	Échec
VQ1769	430	57	15	2	Échec
VQ1769	430	57	30	2	Échec
VQ1769	430	57	30	Continue	Échec