



**HAL**  
open science

# Contrôle de l'hyperplasie intestinale par la kinase PAR-4/LKB1 chez *Caenorhabditis elegans*

Flora Demouchy

► **To cite this version:**

Flora Demouchy. Contrôle de l'hyperplasie intestinale par la kinase PAR-4/LKB1 chez *Caenorhabditis elegans*. Biologie cellulaire. Université de Rennes, 2022. Français. NNT : 2022REN1B057 . tel-04186695

**HAL Id: tel-04186695**

**<https://theses.hal.science/tel-04186695>**

Submitted on 24 Aug 2023

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

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

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ÉCOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : « *Biologie cellulaire, biologie du développement* »

Par

**Flora DEMOUCHY**

**Contrôle de l'hyperplasie intestinale par la kinase PAR-4/LKB1  
chez *Caenorhabditis elegans***

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 2 décembre 2022

Unité de recherche : Institut de Génétique et Développement de Rennes

## Rapporteurs avant soutenance :

Vincent BERTRAND DR CNRS – Institut de Biologie du Développement de Marseille  
Vincent MIROUSE DR CNRS – Génétique Reproduction et Développement

## Composition du Jury :

Président :	Régis GIET	DR CNRS – Institut de Génétique et Développement de Rennes
Examineurs :	Vincent BERTRAND	DR CNRS – Institut de Biologie du Développement de Marseille
	Vincent MIROUSE	DR CNRS – Génétique Reproduction et Développement
	Allison BARDIN	DR CNRS – Institut Curie
	Sophie QUINTIN	CR CNRS – Institut de Génétique, Biologie Moléculaire et Cellulaire

Dir. de thèse :	Grégoire MICHAUX	DR CNRS – Institut de Génétique et Développement de Rennes
Co-dir. de thèse :	Anne PACQUELET	CR INSERM – Institut de Génétique et Développement de Rennes



# Listes des abréviations

AMPK : AMP-activated Protein Kinase

ARNi : ARN interférent

*C. elegans* : *Caenorhabditis elegans*

CeAJ : *Caenorhabditis elegans* Apical Junction

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DIC : Differential Interference Contrast

LKB1 : liver kinase B1

MARK : MAP/microtubule affinity regulating kinase

MELK : Maternal Embryonic Leucine zipper Kinase

MET : microscopie électronique à transmission

Null : mutation nulle

PAR : partitioning defective

PJS : syndrome de Peutz-Jeghers

WT : wild type

# Liste des figures

Figure 1 : Paysages épigénétiques de Waddington publiés en 1957. _____	5
Figure 2 : Organisation de l'intestin chez les larves et adultes <i>C. elegans</i> . _____	9
Figure 3 : Polarité apico-basale des entérocytes chez <i>C. elegans</i> . _____	12
Figure 4 : La bordure en brosse est une structure apicale spécialisée conservée. _____	14
Figure 5 : L'actine ACT-5, est essentielle à la formation des microvillosités chez <i>C. elegans</i> . _____	15
Figure 6 : Les microvillosités ont une ultrastructure très organisée. _____	16
Figure 7 : La plastine-1 participe à la stabilité de la bordure en brosse chez les mammifères, mais pas chez <i>C. elegans</i> . _____	18
Figure 8 : L'ezrine a un rôle conservé dans la formation des microvillosités chez les mammifères et le nématode. _	19
Figure 9 : La protéine EPS-8 régule la taille des microvillosités au sein de la bordure en brosse intestinale chez les mammifères et le nématode. _____	22
Figure 10 : Le réseau terminal est conservé chez les mammifères et le nématode. _____	25
Figure 11 : Trois protéines, IFO-1, SMA-5 et BBLN-1, modulent le réseau de filaments intermédiaires intestinaux et régulent la morphologie de la lumière intestinale chez le nématode. _____	26
Figure 12 : Dans l'intestin du nématode, les entérocytes sont maintenus cohésifs entre eux via une seule entité jonctionnelle : les jonctions apicales ou CeAJ. _____	28
Figure 13 : Les CeAJ se composent de deux complexes distincts. _____	30
Figure 14 : LET-413 est essentielle pour la cohésion des CeAJ ainsi que pour le maintien de la polarité intestinale. _____	32
Figure 15 : Premières divisions embryonnaires de <i>C. elegans</i> . _____	34
Figure 16 : Les différentes étapes du développement de l'intestin. _____	37
Figure 17 : Internalisation de l'endoderme au stade E2 chez <i>C. elegans</i> . _____	40
Figure 18 : Le blastomère E et ses descendants formant l'intestin du nématode. _____	38
Figure 19 : Niveaux protéiques de SKN-1 lors des premières divisions embryonnaires chez <i>C. elegans</i> . _____	41
Figure 20 : Expression de med-1 dans les embryons <i>C. elegans</i> . _____	43
Figure 21 : Expression de end-3 et end-1 dans l'endoderme des embryons <i>C. elegans</i> . _____	44
Figure 22 : La double perte de fonction de l'ubiquitine ligase E3 EEL-1 et de la protéine EFL-1 perturbe la régulation spatiale et temporelle de SKN-1 dans l'embryon <i>C. elegans</i> . _____	47
Figure 23 : GSK-3 contrôle la stabilité protéique de SKN-1 et le devenir cellulaire du blastomère C. _____	48
Figure 24 : Niveaux endogènes de la protéine OMA-1 pendant l'embryogenèse précoce. _____	49
Figure 25 : Le gain-de-fonction de OMA-1 entraîne un excès de cellules intestinales provoqué par la conversion du blastomère C qui adopte un devenir endodermale. _____	50
Figure 26 : La déplétion de GSK-3 empêche la dégradation de OMA-1. _____	51
Figure 27 : La signalisation intercellulaire du blastomère P2 vers EMS permet la spécification des cellules filles de EMS. _____	54
Figure 28 : Le rôle de POP-1 dans la spécification de E, indépendamment de SKN-1. _____	56
Figure 29 : Localisation de la protéine PAL-1 au cours des premières divisions embryonnaires. _____	60
Figure 30 : Voies de signalisation impliquées dans la spécification de E en précurseur de l'endoderme. _____	61
Figure 31 : Localisation de la protéine ELT-2 dans les cellules intestinales du nématode. _____	63
Figure 32 : Arbres de lignage montrant la durée des premières divisions embryonnaires. _____	64
Figure 33 : La phosphatase CDC-25.1 régule le nombre et la vitesse des divisions intestinales. _____	67
Figure 34 : L'adaptateur de substrat LIN-23 régule la stabilité de CDC-25.1 et la prolifération du lignage E mais empêche également la spécification du blastomère C en endoderme. _____	69
Figure 35 : Localisation différentielle de LIN-23. _____	70
Figure 36 : WEE-1.1, une protéine kinase inhibitrice du cycle. _____	71
Figure 37 : La phosphatase CDC-25.1 contrôle l'arrêt des divisions intestinales au stade E16. _____	73
Figure 38 : Le contrôle des divisions intestinales est important pour la morphogenèse. _____	75

<i>Figure 39 : Résumé des phénotypes induisant un excès d'entérocytes.</i>	76
<i>Figure 40 : Les cellules intestinales se polarisent au stade E16.</i>	80
<i>Figure 41 : Ouverture de la lumière formation et formation des microvillosités.</i>	84
<i>Figure 42 : Des réarrangements cellulaires, notamment sous le contrôle de la voie Notch, se produisent pour obtenir le stade E20.</i>	88
<i>Figure 43: Schéma de la protéine LKB1 humaine.</i>	89
<i>Figure 44 : Expression de LKB1 dans l'intestin grêle.</i>	90
<i>Figure 45 : Les protéines PAR sont polarisées dans le zygote.</i>	93
<i>Figure 46 : Ségrégation des déterminants corticaux et cytoplasmiques depuis la fécondation jusqu'au stade 8-cellules du nématode.</i>	94
<i>Figure 47 : Phénotype des embryons mutants PAR-4 aux stades 2-, 4- et 8-cellules.</i>	96
<i>Figure 48 : La polarité de l'ovocyte de drosophile est perturbée dans les mutants lkb1.</i>	99
<i>Figure 49 : LKB1 est requise pour la formation du fuseau de division et la division asymétrique des neuroblastes chez la drosophile.</i>	100
<i>Figure 50 : La suractivation de LKB1 est suffisante pour induire la polarisation de cellules intestinales non polarisées en culture.</i>	104
<i>Figure 51 : PAR-4 régule le cycle cellulaire du blastomère P1 via PLK-1 et CDC-25.1 au stade 2-cellules.</i>	106
<i>Figure 52 : Caractéristiques cliniques du syndrome Peutz-Jeghers (PJS).</i>	110
<i>Figure 53 : Les souris lkb1<sup>+/-</sup> développent des polypes gastrointestinaux.</i>	112
<i>Figure 54 : PAR-1, comme PAR-4, régule le cycle cellulaire du blastomère P1 via PLK-1 et CDC-25.1 au stade 2-cellules.</i>	117
<i>Figure 55 : PAR-4 et PAR-1 contrôlent le devenir cellulaire du lignage C.</i>	126
<i>Figure 56: Les pertes de fonctions de PAR-4 et PAR-1 ne semblent pas induire de stabilisation protéique de SKN-1.</i>	128

---

# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>I. Depuis une cellule œuf jusqu'à un organisme entier en quelques mots</b>	<b>2</b>
1. L'embryon subit quatre étapes majeures au cours de son développement	2
2. Les cellules se différencient progressivement	4
3. L'organisme modèle <i>Caenorhabditis elegans</i>	6
<b>II. Modèle d'étude : l'intestin de <i>Caenorhabditis elegans</i></b>	<b>8</b>
1. A quoi ressemble l'épithélium intestinal du nématode adulte ?	8
a. Organisation des cellules intestinales	8
b. Polarité apico-basale des entérocytes	10
i. L'épithélium intestinal	10
ii. Les microvillosités	11
iii. Les protéines interagissant avec l'actine au sein des microvillosités	15
1) Regroupant les filaments d'actine entre eux	17
2) Reliant l'actine à la membrane plasmique	18
3) Régulant la taille des microfilaments d'actine	21
iv. Le réseau terminal et l'endotube	23
v. Les jonctions apicales	27
vi. Le domaine basolatéral	30
2. Comment se forme l'intestin du nématode ?	33
a. Description des différentes étapes de la formation de l'intestin	33
i. L'intestin entier provient d'une seule cellule : le blastomère E	33
ii. Les divisions successives du blastomère E	35
iii. Les événements cellulaires permettant l'obtention d'un intestin mature	38
b. Un réseau génétique complexe pour spécifier les cellules intestinales	40
i. SKN-1, un acteur essentiel à la spécification des entérocytes	40
ii. Les protéines MED-1,2 participent à la spécification de l'endoderme	42
iii. END-1,3 : les premiers facteurs de transcription spécifiques de l'intestin	44
iv. Régulation de l'activité et/ou de la dégradation de SKN-1	45
1) Dégradation de SKN-1 par EEL-1	45
2) Dégradation de SKN-1 dans le blastomère C par GSK-3 et OMA-1	47
3) Dégradation de SKN-1 dans le blastomère EMS : rôle d'ubiquitines ligases basées sur les cullines CUL-1 et CUL-2	51
4) Inactivation de SKN-1 dans le blastomère P2 : rôle de PIE-1	52
v. Rôle de POP-1	53
vi. Rôle de PAL-1	58
c. Les facteurs ELT-2 et ELT-7, acteurs majeurs de la différenciation des entérocytes	62
d. Régulation des divisions des entérocytes	64
i. Spécificités du lignage intestinal	64
ii. Lien entre la spécification et les divisions intestinales	65
iii. Principaux acteurs du cycle : contrôle de la vitesse et/ou du nombre de division	66
1) La phosphatase CDC-25.1	66
2) LIN-23, le régulateur de CDC-25.1	68
3) La phosphatase CDC-25.2	70
4) La kinase inhibitrice du cycle WEE-1.1	71
5) L'inhibiteur de CDK CKI-1	72

iv.	Importance de la régulation des divisions pour la morphogenèse	73
e.	Résumé des phénotypes induisant un excès d'entérocytes chez le nématode	76
f.	Etablissement de la polarité apico-basale intestinale	76
i.	Etapas de la polarisation intestinale	76
ii.	Mécanismes régulateurs de la polarisation intestinale	81
g.	Ouverture de la lumière intestinale et formation des microvillosités	82
h.	Mouvements cellulaires influençant l'organogenèse intestinale	83
i.	De nombreux réarrangements cellulaires forment l'intestin mature	83
ii.	Régulation de ces mouvements cellulaires	86
<b>IV.</b>	<b>Rôles des protéines kinases LKB1 et PAR-4</b>	<b>89</b>
1.	Lkb1 fonctionne au sein d'un complexe protéique	89
2.	Les fonctions cellulaires des protéines LKB1/PAR-4	92
a.	Polarisation cellulaire et division asymétrique	92
i.	Découverte de la protéine PAR-4 chez le nématode	92
ii.	Rôle de PAR-4 dans la ségrégation de facteurs dans l'embryon précoce	94
iii.	Dans le nématode, PAR-4 agit ou non en complexe avec STRD-1	97
iv.	Fonctions de PAR-4/LKB1 dans des contextes différents de <i>C. elegans</i>	99
1)	Chez la drosophile	99
2)	Dans les cellules épithéliales en culture	102
3)	Dans l'embryon de souris	104
b.	Cycle cellulaire	105
c.	Prolifération cellulaire et apoptose	107
3.	Les rôles de LKB1/PAR-4 chez l'être humain et la souris	109
a.	Implication de LKB1 dans le syndrome de Peutz-Jeghers	109
b.	Modèles de PJS chez la souris : étude des polypes	112
c.	LKB1, un suppresseur de tumeur	114
4.	Quelques cibles de PAR-4/LKB1	115
a.	La protéine kinase PAR-1/MARK est un effecteur majeur de PAR-4/LKB1	115
b.	Régulation de GSK3 $\beta$ par LKB1	117
<b>V.</b>	<b>Objectif de la thèse</b>	<b>120</b>
<b>Résultats</b>		<b>121</b>
<b>I.</b>	<b>Article scientifique</b>	<b>122</b>
<b>II.</b>	<b>Résultats complémentaires</b>	<b>123</b>
<b>III.</b>	<b>Contribution à un article</b>	<b>131</b>
<b>Discussion</b>		<b>133</b>
<b>I.</b>	<b>PAR-4 contribue à la régulation de la taille des microvillosités et des jonctions apicales</b>	<b>134</b>
1.	Rôle mineur de PAR-4 sur la taille des microvillosités	135
a.	Potentielle implication de certains composants de la bordure en brosse	135
b.	Rôle de PAR-4 sur la phosphorylation de l'ezrine ?	136
c.	Défauts des microvillosités et développement du nématode	136
2.	Rôle mineur de PAR-4 dans la régulation de la longueur des jonctions apicales	137
3.	Localisation de PAR-4 et polarisation des entérocytes	137
<b>II.</b>	<b>Conséquences développementales d'un excès d'entérocytes</b>	<b>138</b>
1.	Dans les larves	138

2.	Formation de la lumière intestinale _____	139
3.	Organisation des cellules intestinales au sein du tissu _____	139
a.	Dans les embryons tardifs _____	139
b.	Au cours du développement intestinal _____	140
<b>III.</b>	<b>Régulation de la spécification des blastomères embryonnaires par PAR-4 et PAR-1 _____</b>	<b>141</b>
1.	Rôle de PAR-4 sur l'expression de end-1 et elt-2 _____	141
2.	Quelles sont les voies de signalisation impliquées ? _____	143
a.	PAR-1 régule également la spécification du blastomère C _____	143
b.	Implication de MED-1 _____	143
c.	Implication de SKN-1 _____	144
d.	Un autre régulateur possible : PAL-1 _____	144
e.	Expériences pour tester l'implication SKN-1 et PAL-1 _____	145
3.	Caractérisation fine du devenir des descendants de C qui adoptent un destin intestinal _____	146
a.	Rythme de divisions _____	146
b.	Changement d'identité cellulaire _____	147
	<b>Références bibliographiques _____</b>	<b>148</b>

# Introduction

## I. Depuis une cellule œuf jusqu'à un organisme entier en quelques mots

### 1. L'embryon subit quatre étapes majeures au cours de son développement

Dès l'Antiquité, l'humanité a cherché à déterminer comment s'effectue la génération de nouveaux organismes. Il y a presque deux siècles, la théorie cellulaire est formulée par le botaniste allemand Mathias Schleiden chez les végétaux, puis étendue aux animaux par le zoologiste allemand Theodor Schwann. En 1839, ce dernier publie un livre « Recherches microscopiques sur les similarités de structure et de développement entre les animaux et les plantes ». Il démontre que tous les organismes vivants sont formés de cellules, qui est depuis lors considéré comme l'unité du vivant.

Du nématode à l'être humain, de très nombreuses recherches effectuées depuis des décennies montrent que les processus de développement reposent essentiellement sur des activités cellulaires fondamentales. La formation d'un embryon, puis un adulte, à partir d'une seule cellule-œuf nécessite que les cellules prolifèrent, communiquent entre elles, s'informent mutuellement de leur position au sein de l'embryon, subissent des changements de forme, se déplacent, se regroupent, se différencient et dans certains cas, entrent en apoptose qui correspond à la mort cellulaire programmée. L'ensemble de ces activités cellulaires est coordonné spatialement et dans le temps de manière fine et sous le contrôle de gènes du développement.

Le développement embryonnaire peut se découper en quatre étapes majeures : la fécondation, la segmentation, la gastrulation et l'organogenèse. Chacune de ces étapes est marquée par l'émergence d'évènements cellulaires et moléculaires qui ne peuvent se dérouler qu'à la condition que les étapes précédentes aient été réalisées normalement. Le développement d'un embryon nécessite la mise en place de polarités définissant des axes embryonnaires le long desquels vont s'organiser les futures parties de l'organisme. Ainsi, les embryons peuvent acquérir un avant et un arrière (axe antéro-postérieur, A-P), un ventre et un dos (axe dorso-ventral, D-V) et des côtés droit et gauche (axe droite-gauche, D-G) (Sardet et al. 2004). L'organogenèse repose sur une expression du génome zygotique propre à chaque espèce. Elle fait également intervenir un processus de différenciation cellulaire conduisant à la réalisation du plan d'organisation final.

La **biologie du développement** consiste à décrire comment chacune de ces étapes se réalise. Elle étudie les mécanismes moléculaires qui font que chacun des feuilletts embryonnaires primordiaux (endoderme, mésoderme, ectoderme) s'agence avec précision en fonction des axes de polarité antéro-postérieur, dorso-ventral ou gauche-droite. Les études effectuées dans le domaine de la biologie du

développement permettent, à titre d'exemple, de déterminer comment chacun des feuillets embryonnaires évolue au cours du développement pour donner les 50 000 milliards de cellules et les 350 types cellulaires qui constituent l'être humain.

La **fécondation** correspond au processus de fusion entre un gamète haploïde mâle et un gamète haploïde femelle. Cette fusion conduit à la formation d'un zygote diploïde. Les toutes premières études portant sur la fécondation ont été effectuées dans les années 1870 sur des espèces marines à fécondation externe tels que l'oursin.

Le zygote subit ensuite une étape de **segmentation** pour former successivement un embryon constitué de deux, quatre, huit cellules, puis seize cellules, couramment appelé morula chez les mammifères. Les premières divisions de l'embryon, nommées clivages, aboutissent à la formation de blastomères. Ces divisions sont très rapides car il n'existe pas de phase de croissance entre les divisions successives. Ainsi, il ne s'agit que d'une alternance entre des phases de réplication de l'ADN (phases S) et des phases de mitose (phases M). Ces divisions n'entraînent pas de croissance de l'embryon : elles partitionnent le cytoplasme de l'embryon dont les cellules deviennent de plus en plus nombreuses mais également de plus en plus petites. Les produits de ces clivages sont appelés les blastomères. Au début du développement embryonnaire, la transcription du génome zygotique est activée faiblement et plus ou moins tardivement selon les espèces (Tadros and Lipshitz 2009). Ainsi, à ce stade, la synthèse protéique de tous les facteurs nécessaires pour ces clivages est médiée par les ARN messagers transcrits au cours de l'ovogenèse et les protéines enrichies dans l'ovocyte et qui perdurent au cours de l'embryogenèse précoce. Ce stade développemental repose donc sur la contribution maternelle en déterminants du développement.

Une fois que la vitesse de division mitotique ralentit via l'incorporation de phases de croissance dans le cycle cellulaire, les blastomères entrent dans une phase de mouvements cellulaires appelée **gastrulation**. Les blastomères vont ainsi changer de positions dans l'embryon les uns par rapport aux autres. Ce processus développemental convertit la « boule » de cellules en une structure constituée de trois couches cellulaires, appelée gastrula. Ces mouvements morphogénétiques impliqués dans la gastrulation varient selon l'espèce. Toutefois, ils conduisent fondamentalement à la formation de trois feuillets tissulaires embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. La couche externe correspond à l'ectoderme qui forme ensuite la peau et le système nerveux ; la couche intermédiaire est le mésoderme qui produit notamment les muscles et le tissu conjonctif ; et la couche interne correspond à l'endoderme qui formera ensuite l'épithélium intestinal.

Dès lors que ces trois feuillets embryonnaires sont établis, les cellules interagissent entre elles et se réarrangent au sein de l'embryon pour produire les tissus et les organes. Ce processus est appelé **organogenèse**. De nombreux organes contiennent des cellules issues de plus d'un feuillet embryonnaire. Il n'est pas rare que la couche externe d'un organe provienne d'un feuillet et la couche interne d'un feuillet différent. Par exemple, la couche externe de la peau (épiderme) est issue de l'ectoderme tandis que la couche interne de la peau (le derme) provient du mésoderme. Au cours de l'organogenèse, certaines cellules subissent de longues migrations depuis leur place originelle jusqu'à leur localisation finale. C'est le cas notamment des cellules sanguines ou des gamètes.

## **2. Les cellules se différencient progressivement**

Le développement de cellules spécialisées est appelé différenciation. Cette étape définitive est précédée d'un processus progressif pour que chaque cellule adopte *in fine* une identité cellulaire (**fig. 1**).

La première étape est appelée **spécification**. Le destin d'une cellule est dit spécifié quand la cellule est capable de se différencier de manière autonome lorsqu'elle est isolée et placée dans un environnement neutre. A ce stade, la cellule n'exprime pas encore les gènes qui lui permettront d'exercer une fonction spécialisée. On distingue parfois la spécification de la **détermination**. Dans ce cas, la spécification, qui précède la détermination, est considérée comme un processus réversible : le destin d'une cellule spécifiée peut varier suite à des modifications de l'environnement. Au contraire, une cellule est dite déterminée quand elle est capable de se différencier de manière autonome quel que soit son environnement, par exemple même lorsqu'elle est placée dans une région différente de l'embryon. La détermination est donc un processus irréversible. Enfin, la cellule déterminée va adopter son identité cellulaire terminale : c'est la **différenciation**. Cela correspond à l'acquisition d'une fonction et d'une morphologie spécialisée définitive. Une cellule différenciée exprime alors un répertoire de gènes spécifiques de son type cellulaire.

Il existe trois types de spécification : autonome, syncytiale ou conditionnée.

Dans le cas de la **spécification autonome**, si les blastomères acquièrent leur identité indépendamment d'interactions cellulaires. Dans ce cas, si un blastomère est isolé d'un embryon au cours de son développement précoce, alors il est capable de produire les mêmes types cellulaires que s'il faisait toujours partie intégrante de l'embryon. De plus, l'embryon dans lequel ce blastomère a été enlevé est capable de se développer : il ne présentera pas les tissus normalement produits par le blastomère isolé. Cette spécification autonome donne naissance à un développement mosaïque, au cours duquel la perte

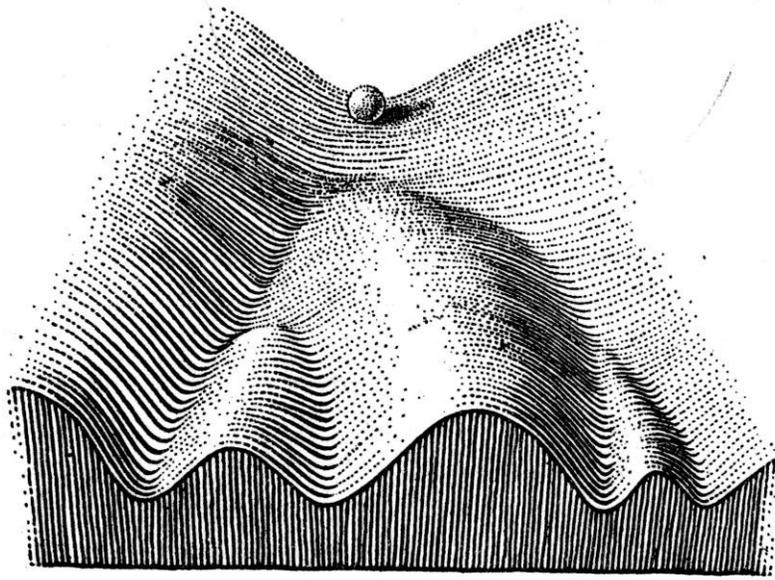


FIGURE 4

*Part of an Epigenetic Landscape.* The path followed by the ball, as it rolls down towards the spectator, corresponds to the developmental history of a particular part of the egg. There is first an alternative, towards the right or the left. Along the former path, a second alternative is offered; along the path to the left, the main channel continues leftwards, but there is an alternative path which, however, can only be reached over a threshold.

**Figure 1 : Paysages épigénétiques de Waddington publiés en 1957.**

Ce schéma historique montre le processus de différenciation cellulaire. La balle représente une cellule. Les vallées montrent les chemins possibles pour le destin cellulaire ; les collines correspondent à la difficulté de changer de chemin. Au tout début de son parcours de différenciation, le zygote est totipotent : tous les devenir cellulaires sont possibles. La cellule peut s'engager dans une voie en préservant sa capacité à changer de voie cellulaire : elle est alors spécifiée. Au fur et à mesure qu'elle progresse dans son parcours de différenciation, ce nombre de possibilités diminue. Schéma tiré de (Waddington C.H. 1957).

d'une cellule ne peut être compensée par les autres blastomères. Dans ces organismes, des déterminants morphogénétiques, tels que des protéines ou des ARN messagers, sont enrichis à différentes régions du cytoplasme de l'œuf et sont ségrégués asymétriquement dans les différentes cellules à mesure que l'embryon se divise. Ces déterminants morphogénétiques spécifient le type cellulaire. Les divisions asymétriques sont alors essentielles pour le devenir cellulaire. De nombreux invertébrés ont un développement de type mosaïque. Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, la spécification est essentiellement autonome grâce à la répartition asymétrique précoce de déterminants morphogénétiques (Maduro 2010). Elle est cependant également modulée par les interactions entre

certaines blastomères. Ces interactions ne permettent néanmoins pas de compenser la perte d'un blastomère, le développement de *C. elegans* est donc considéré comme mosaïque.

Le deuxième mode de spécification est dit **conditionnel**. Il implique l'interaction entre les cellules voisines au sein de l'embryon. Dans ce type de spécification, chaque cellule a initialement la capacité d'adopter n'importe quel type cellulaire. Cependant, les interactions de la cellule avec d'autres cellules voisines restreignent son devenir cellulaire à une seule ou quelques possibilités seulement. Ainsi, la spécification conditionnelle correspond au fait que le destin d'une cellule dépend des conditions dans laquelle la cellule se trouve. Ce type de spécification génère un développement régulateur qui est observé dans de nombreux embryons de vertébrés. Dans ce type de développement, la perte d'un blastomère peut être compensée par la spécification d'autres cellules.

Enfin, chez de nombreux insectes, la spécification est dite **syncytiale**. Lorsque les embryons précoces se divisent, la division cellulaire n'est pas complète. Les noyaux se divisent au sein du cytoplasme de l'œuf, créant ainsi la présence de nombreux noyaux dans une seule grande cellule. Il s'agit d'un syncytium. Toutefois, le cytoplasme de l'œuf n'est pas uniforme : son pôle antérieur est distinct de son pôle postérieur. Ainsi, la spécification ne se déroule pas entre les cellules, mais entre les différentes parties d'une seule cellule. Chez la drosophile, des morphogènes ont été mis en évidence. Ils correspondent à des protéines synthétisées à partir des déterminants maternels ségrégués asymétriquement au sein de l'ovocyte. Ainsi, au pôle antérieur de l'embryon, il existe un gradient de la protéine Bicoid. A l'opposé, au pôle postérieur de l'embryon, il s'agit d'un gradient de la protéine Nanos. La concentration de la protéine Bicoid est la plus élevée au pôle antérieur puis décroît vers le pôle postérieur, et réciproquement pour Nanos. A mesure que les noyaux se divisent et entre dans différentes régions du cytoplasme du syncytium, ils reçoivent une instruction de spécification en fonction du ratio Bicoid:Nanos selon leur position le long de l'axe antéro-postérieur. Ainsi, les noyaux dans les régions avec un niveau élevé de Bicoid et bas de Nanos activeront les gènes nécessaires à la formation de la tête. A l'inverse, les noyaux dans les régions avec un niveau bas de Bicoid et élevé de Nanos activeront les gènes qui généreront l'abdomen.

### **3. L'organisme modèle *Caenorhabditis elegans***

Le nématode *C. elegans* est un organisme modèle invertébré qui est étudié par de nombreux biologistes du développement. En effet, son lignage cellulaire a été décrit : il est stéréotypé et invariant d'un organisme à un autre (Sulston et al. 1983). Par ailleurs, ce nématode, et ses embryons, sont

transparents ce qui facilite son observation au microscope. Il est alors possible d'observer en temps réel son développement et les processus cellulaires sous-jacents.

Son développement embryonnaire précoce est caractérisé par des divisions asymétriques essentielles pour que les cellules se spécifient correctement et adoptent leur identité cellulaire. Ces divisions asymétriques permettent la ségrégation de déterminants cytoplasmiques et corticaux, issus d'une contribution maternelle, spécifiquement dans certaines cellules.

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé cet organisme modèle afin d'étudier le rôle de la protéine kinase PAR-4/LKB1 lors de la formation de l'intestin. Puisque cet organe est produit de façon clonale à partir d'un seul blastomère, mon projet de recherche a consisté à caractériser la fonction de PAR-4 depuis la spécification intestinale jusqu'à l'organogenèse et l'organisation de l'épithélium intestinal.

## II. Modèle d'étude : l'intestin de *Caenorhabditis elegans*

### 1. A quoi ressemble l'épithélium intestinal du nématode adulte ?

#### a. Organisation des cellules intestinales

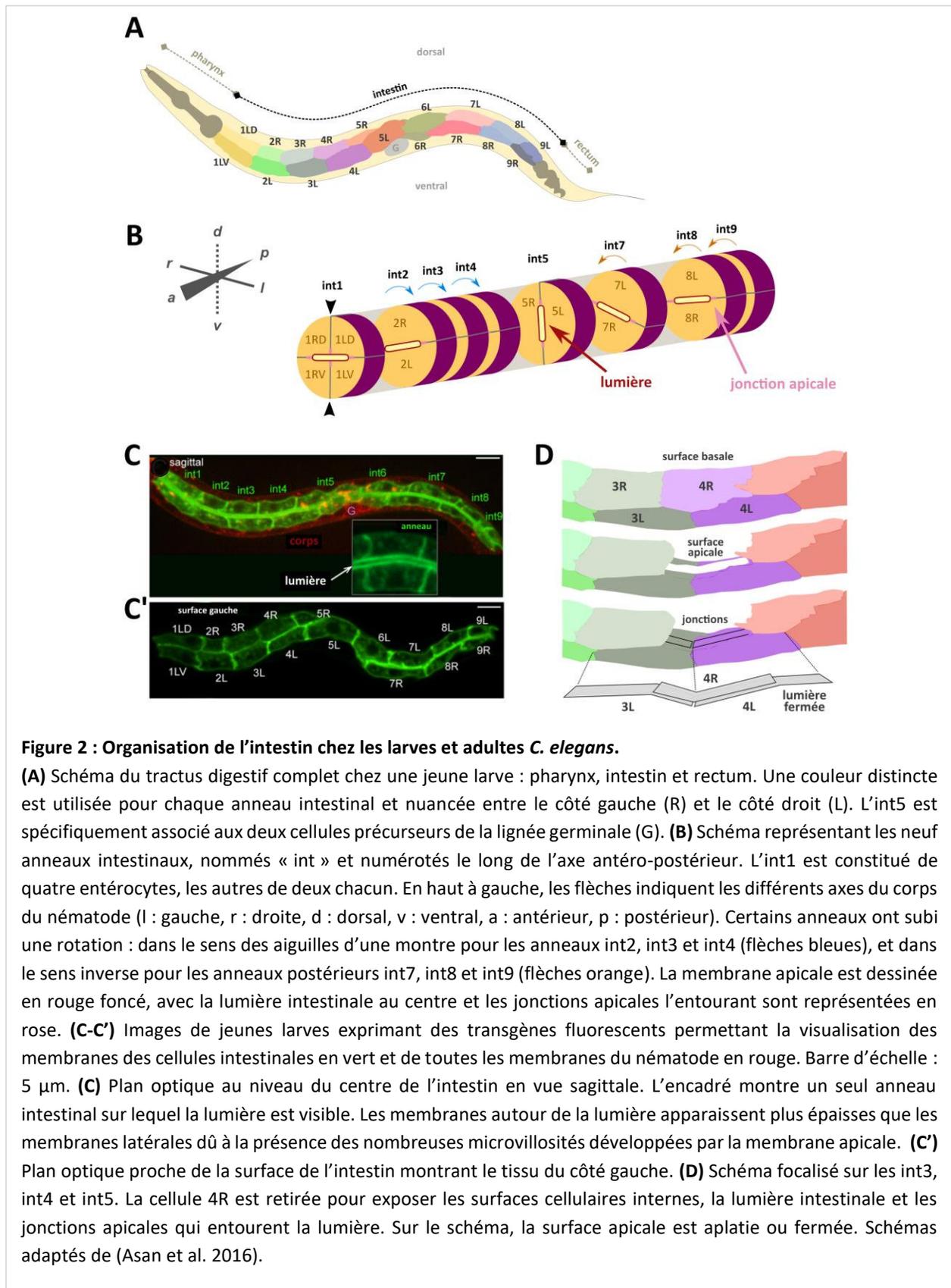
Chez *C. elegans*, le tractus digestif se compose de trois tubes épithéliaux : le pharynx, l'intestin et le rectum (**fig. 2A**). Ces tubes s'organisent avec un nombre étonnamment faible de cellules. Ainsi, le pharynx contient 95 cellules, l'intestin contient 20 cellules tandis que 11 cellules composent le rectum (Kormish, Gaudet, and McGhee James D. 2010; Sulston et al. 1983). L'intestin du nématode est flanqué de la valve pharyngale-intestinale et du rectum. Situées à la jonction entre le pharynx et l'intestin, les trois cellules pharyngales de la valve s'organisent en anneaux et s'orientent vers une ligne médiane centrale, créant ainsi un tractus digestif continu et régulier (Cote and Feldman 2022; Shaye and Soto 2021).

Les vingt cellules intestinales, ou entérocytes, s'organisent pour former un tube creux. Ainsi, l'intestin du nématode est un épithélium très simple, représentant de ce fait un système d'étude propice à l'analyse de la polarisation épithéliale se déroulant lors du processus d'organogénèse.

Les cellules intestinales s'agencent en une série antéro-postérieure d'anneaux intestinaux (**fig. 2A-C**) (Asan, Raiders, and Priess 2016; Leung, Hermann, and Priess 1999). Le premier anneau intestinal – le plus antérieur le long du tube – est constitué de quatre entérocytes tandis que tous les autres sont composés de deux cellules chacun (**fig. 2B**). Ainsi, les cellules intestinales entourent la lumière au sein de laquelle seront véhiculés les nutriments issus de la nourriture. L'organisation en anneaux intestinaux s'effectue de telle sorte que la membrane apicale des entérocytes fait face à la lumière intestinale. Les cellules intestinales sont reliées entre elles par des jonctions, maintenant l'intégrité de l'épithélium (**fig. 2B,D**). Ces jonctions s'organisent selon un motif rectiligne d'échelle caractéristique, induit par l'agencement des anneaux intestinaux (**fig. 2D**).

Les anneaux intestinaux, ou « int », sont numérotés en fonction de leur position le long de l'axe antéro-postérieur, avec les int 1 et 9 étant respectivement les plus antérieur ou postérieur (**fig. 2A-C**). Les entérocytes constituant un anneau intestinal proviennent de lignages cellulaires symétriques selon l'axe gauche-droite. De plus, ces entérocytes adoptent une forme cellulaire similaire au sein d'un même anneau. Toutefois, les anneaux intestinaux ne sont pas tous équivalents le long de l'axe antéro-postérieur. Par exemple, les cellules de l'int 5 sont associées spécifiquement aux deux cellules précurseurs de la lignée germinale (**fig. 2A**). Il existe également des différences quant à l'expression de certains gènes. A titre d'illustration, seules les cellules des int 3 à int 9 expriment la phosphatase acide PHO-1 qui est ainsi absente

des deux premiers anneaux intestinaux (Fukushige et al. 2005). Les mécanismes exacts sous-jacents à cette



expression différentielle ne sont pas connus, mais semblent impliquer la voie Wnt (Fukushige et al. 2005).

Au cours du développement de l'épithélium intestinal, certains anneaux intestinaux subissent une rotation. Si nous observons l'intestin depuis son côté antérieur, les rotations s'effectuent dans le sens des aiguilles d'une montre pour les anneaux int 2, int 3 et int 4, et dans le sens inverse pour les anneaux postérieurs int 7, int 8 et int 9 (**fig. 2A-C** ; (Asan et al. 2016)). De plus, les limites antérieures et postérieures de deux anneaux symétriques ne sont pas strictement alignées (**encadré fig. 2C**).

## **b. Polarité apico-basale des entérocytes**

### **i. L'épithélium intestinal**

Comme précisé succinctement ci-dessus, l'intestin du nématode, comme celui des mammifères, est un tissu épithélial.

Les tissus épithéliaux tapissent la surface du corps, les cavités internes et les organes creux. Ils forment une barrière entre deux milieux de natures différentes : le milieu extérieur et les tissus sous-jacents. Les épithélia remplissent diverses fonctions, comme la protection mécanique de l'épiderme ou celle, chimique, de l'épithélium gastrique. Ils sont constitués par des cellules fortement cohésives entre elles via des systèmes de jonctions cellulaires. De plus, les cellules épithéliales sont caractérisées par leur polarité apico-basale, essentielle au bon fonctionnement des tissus qu'elles composent. Pour assurer leur fonction, certaines cellules épithéliales peuvent, sous le contrôle de protéines de polarité, développer des protrusions à leur surface apicale qui permettent d'amplifier leur surface pour promouvoir par exemple la transduction sensorielle ou faciliter l'absorption de nutriments ou de solutés. Ainsi, les cellules vibratiles de la cochlée sont recouvertes de cils apicaux dont la mise en mouvement par une onde sonore permet la libération de neurotransmetteurs. Les stéréocils de l'épididyme favorisent quant à eux le transport des spermatozoïdes. Les microvillosités, caractéristiques des cellules intestinales et des cellules du tube proximal du rein, favorisent l'absorption des nutriments, de l'eau ou encore des solutés (Apodaca 2018).

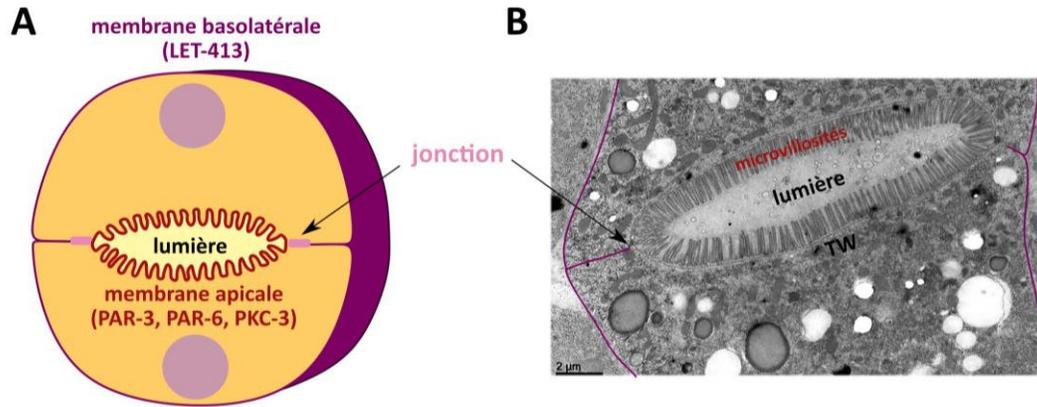
Ainsi, les cellules intestinales, comme toutes les cellules épithéliales, sont polarisées selon leur apico-basal. Leur domaine apical se situe en face de la lumière intestinale tandis que leur domaine basolatéral est en contact avec les tissus sous-jacents (**fig. 3A,B** ; (Leung et al. 1999)). Le pôle apical des cellules intestinales est déterminé par la présence du module PAR-3/PAR-6/PKC-3<sup>aPKC</sup> (**fig. 3A**). J'expliquerai en détails dans la partie **2f**. comment les entérocytes se polarisent au cours du développement du tissu intestinal chez le nématode. A l'opposé, le pôle basolatéral est marqué par la

présence de la protéine LET-413<sup>Scribble</sup> chez *C. elegans*, essentielle au maintien de la polarité apico-basale intestinale (**fig. 3A**). Les jonctions apicales délimitent les deux pôles cellulaires. Alors que la protéine Crumbs est essentielle à la formation des microvillosités dans les entérocytes chez la souris, elle n'est pas requise pour l'établissement de la polarité chez *C. elegans* ou la drosophile (Chen et al. 2018; Waaijers et al. 2015; Whiteman et al. 2014). Essentiel à la survie des animaux, l'intestin permet d'absorber les nutriments qui proviennent de la nourriture ingérée et circulent dans la lumière intestinale. Il le fait principalement grâce aux microvillosités développées à la membrane apicale des entérocytes (**fig. 3A,B**). Le maintien de cette polarité est également crucial pour la bonne localisation des transporteurs exprimés aux pôles apical et basolatéral.

## ii. Les microvillosités

Afin de maximiser l'absorption des nutriments issus de la lumière intestinale, les entérocytes augmentent leur surface d'échange avec ces nutriments en développant des prolongements membranaires à leur pôle apical. Chacune des extensions de la membrane apicale est nommée microvillosité. Ensemble, elles forment une structure intestinale spécialisée dans l'absorption des nutriments : la bordure en brosse. Ainsi, chez l'être humain, des estimations basées sur des observations en microscopie électronique et optique suggèrent que les microvillosités amplifient la surface intestinale d'échange avec les nutriments d'un facteur de 9 à 16 (Helander and Fändriks 2014). Les microvillosités sont des extensions cellulaires, mais les villosités et les repliements du tissu présents chez les vertébrés maximisent également la surface apicale à l'échelle du tissu.

La surface spécialisée du pôle apical des cellules intestinales épithéliales a été pour la première fois décrite par Jacob Henle en 1837 chez le lapin (Henle Jakob 1837). Sujet à controverse, deux hypothèses principales étaient alors évoquées au sein de la communauté scientifique de l'époque. Ces striations pouvaient représenter soit des cils membranaires, soit des pores membranaires (BAKER 1942). La nature striée de la bordure en brosse intestinale a été confirmée par des observations en microscopie électronique en 1950 chez le rat (**fig. 4A** ; (Granger and Baker 1950)). Son ultrastructure n'a été caractérisée que quelques dizaines d'années plus tard, dans les années 1970 chez la souris et le poulet grâce à des observations en MET (**fig. 4B,C** ; (Mooseker and Tilney 1975; MUKHERJEE and STAEHELIN 1971)).



**Figure 3 : Polarité apico-basale des entérocytes chez *C. elegans*.**

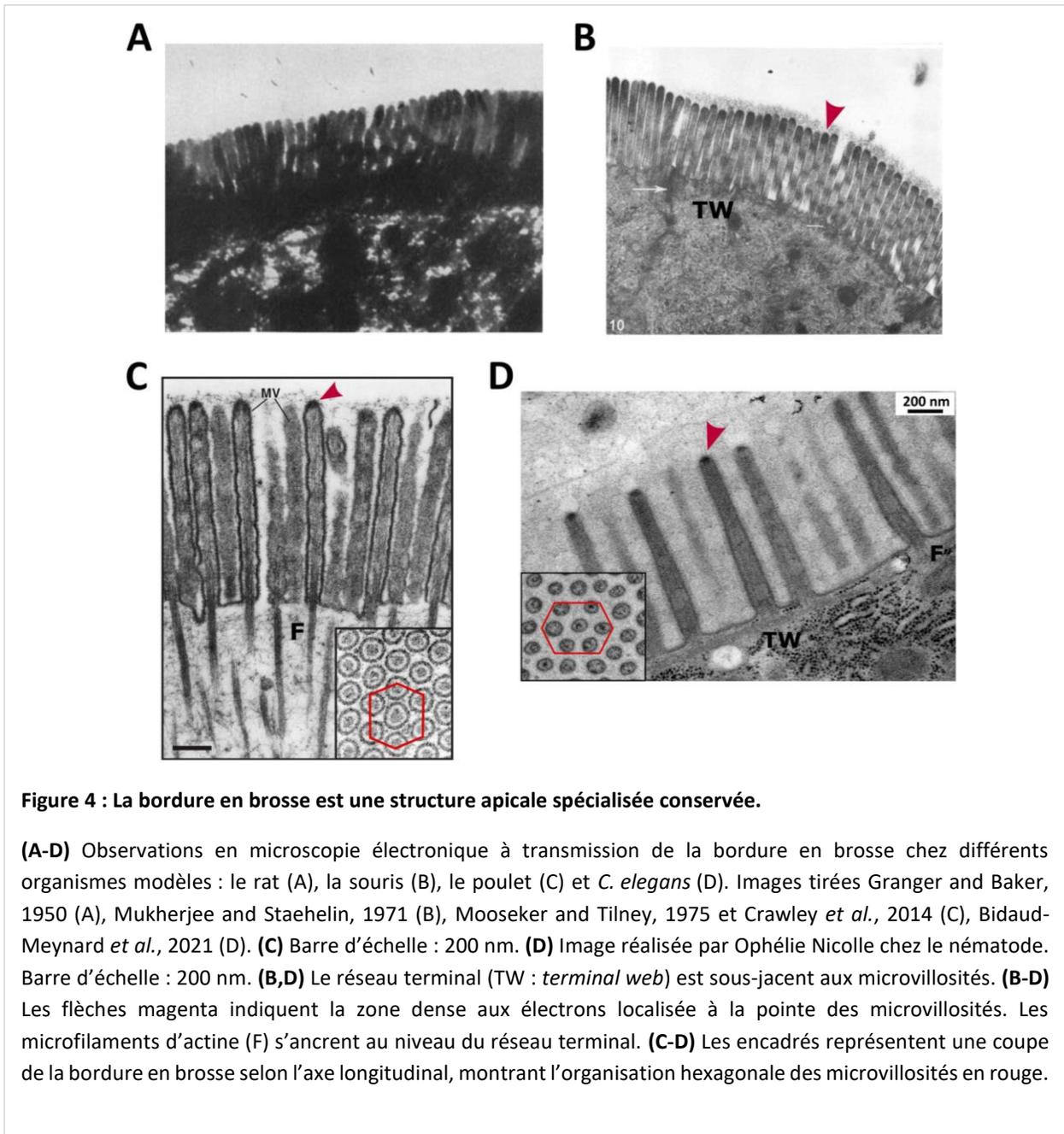
(A) Schéma d'un anneau intestinal en vue transversale. Sur les neuf anneaux, huit sont constitués par deux cellules intestinales organisées en face à face, reliées par des jonctions (rose) et entourant la lumière centrale. De forme centrosymétrique chez le nématode, les entérocytes sont polarisés selon leur axe apico-basal. Leur membrane apicale (rouge) est située face à la lumière intestinale tandis que leur membrane basolatérale (magenta) est reliée aux tissus sous-jacents. Des déterminants de polarité sont exprimés sur chacun des deux pôles cellulaires : le module PAR-3, PAR-6, PKC-3 en apical et la protéine LET-413 en basolatéral. Les cellules intestinales ont la particularité de développer des prolongements membranaires à leur pôle apical, nommées microvillosités, élaborant ensemble la bordure en brosse. (B) Image obtenue en microscopie électronique à transmission (MET) montrant la bordure en brosse intestinale d'un jeune adulte *C. elegans*. La lumière intestinale est bordée par les jonctions apicales. Le réseau terminal (terminal web : TW) est sous-jacent aux microvillosités. Barre d'échelle : 2  $\mu$ m. Réalisée par Ophélie Nicolle.

Tout d'abord, la taille des microvillosités est très remarquablement uniforme au sein de la bordure en brosse. Chez l'être humain adulte, les microvillosités mesurent environ 100 nm de largeur et de 1 à 3  $\mu$ m de longueur selon la région du tractus intestinal concerné. De plus, ces protrusions membranaires présentent une disposition très ordonnée de sorte que lorsque la bordure en brosse est observée de face, des réseaux hexagonaux de microvillosités sont visibles (fig. 4C ; pour revue : (Crawley, Mooseker, and Tyska 2014)). Chez les jeunes adultes *C. elegans*, les microvillosités mesurent environ 120 nm de largeur et 900 nm de longueur (fig. 4B,D ; (Bidaud-Meynard et al. 2021)). De plus, la densité de microvillosités a été caractérisée : environ 5 protrusions se développent par micromètre de membrane apicale (Bidaud-Meynard et al. 2021). De façon similaire à ce qui a été décrit chez l'être humain, les microvillosités de *C. elegans* s'organisent en réseaux hexagonaux visibles en vue longitudinale (fig. 4D ; (Bidaud-Meynard et al. 2021)). Je détaillerai la formation de la bordure en brosse chez *C. elegans* dans la partie 2g.

L'actine filamenteuse est le composant de base du squelette des microvillosités (Bretscher and Weber 1978; MUKHERJEE and STAEHELIN 1971). Toutefois, un seul filament d'actine ne suffirait pas à déformer la membrane et former une protrusion stable. Ainsi, les microvillosités contiennent plusieurs filaments d'actine parallèles, environ 30-40 chacune chez les vertébrés, reliés entre eux (Ohta et al. 2012). Ces derniers forment ainsi un faisceau d'actine d'environ 50-60 nm de diamètre. Tous les filaments d'actine au sein de chaque microvillosité adoptent la même orientation (Mooseker and Tilney 1975). Ainsi, le faisceau d'actine s'attache à la membrane plasmique de la pointe de la protrusion. Il s'étend ensuite sur toute la longueur de la microvillosité et s'étire encore davantage en subapical pour rejoindre la région du réseau terminal (**fig. 4C** ; (Mooseker and Tilney 1975) ; détaillé dans la partie **iv**). La partie basale des filaments d'actine localisée au sein du réseau terminal est nommée « racines d'actine ». Je détaillerai plus en détails la structure du réseau terminal des cellules intestinales dans la partie **iv**.

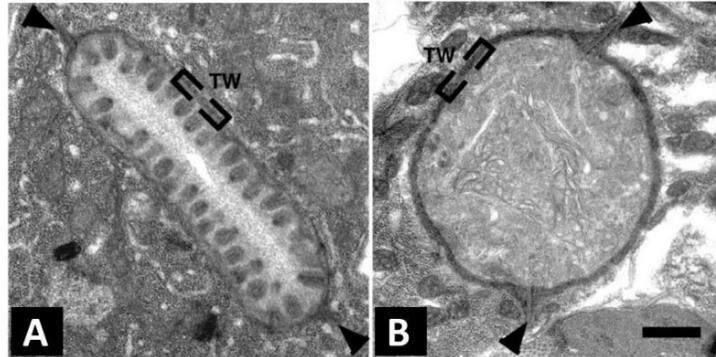
Dans les microvillosités, chaque filament d'actine constituant le faisceau est polarisé. En effet, une caractérisation détaillée de l'organisation de l'actine a montré que les taux d'association et/ou de dissociation des monomères d'actine diffèrent à chaque extrémité des microfilaments (Pollard and Mooseker 1981). Des expériences d'isolation de bordure en brosse ont montré que la croissance des filaments d'actine s'effectue préférentiellement à la pointe des microvillosités (Mooseker, Pollard, and Wharton 1982; Pollard and Mooseker 1981), l'ajout de monomères ayant lieu à la pointe des microfilaments d'actine, appelée extrémité barbue ou extrémité (+). A l'inverse, les monomères d'actine sont désassemblés à la base des microvillosités, au sein du réseau terminal, appelée extrémité pointue ou extrémité (-), correspondant ainsi à la région de dépolymérisation (Mooseker et al. 1982; Pollard and Mooseker 1981). Il existe donc un équilibre dynamique entre la polymérisation et la dépolymérisation des monomères d'actine qui maintient une longueur constante pour chaque microfilament (Pollard and Borisy 2003).

Comme décrit ci-dessus, les microvillosités sont principalement constituées par des filaments d'actine. Chez *C. elegans*, l'actine ACT-5, est spécifiquement exprimée dans l'intestin et localisée au pôle apical des entérocytes (**fig. 5** ; (Macqueen et al. 2005)). Il a été montré que l'ACT-5 est un composant majeur des microvillosités. En effet, sa déplétion induit une absence totale de microvillosités, ayant pour conséquence directe une létalité larvaire (**fig. 5** ; (Macqueen et al. 2005)). Par ailleurs, la déplétion d'ACT-5 entraîne également l'apparition d'une lumière intestinale arrondie (**fig. 5**).



Je détaillerai dans les parties suivantes les structures et protéines caractéristiques de la polarité apicale des cellules intestinales (microvillosités, réseau terminal et jonctions) mais aussi de leur polarité basolatérale. Le système intestinal a été décrit très largement chez les mammifères, mais il est désormais connu que la majeure partie des protéines impliquées est conservée chez le nématode. De plus, les microvillosités et la bordure en brosse intestinale du nématode adoptent une structure globale très

similaire à celle des vertébrés. Ainsi, dans ma thèse, je focaliserai mon propos sur la description de la polarité épithéliale des entérocytes essentiellement chez *C. elegans*.



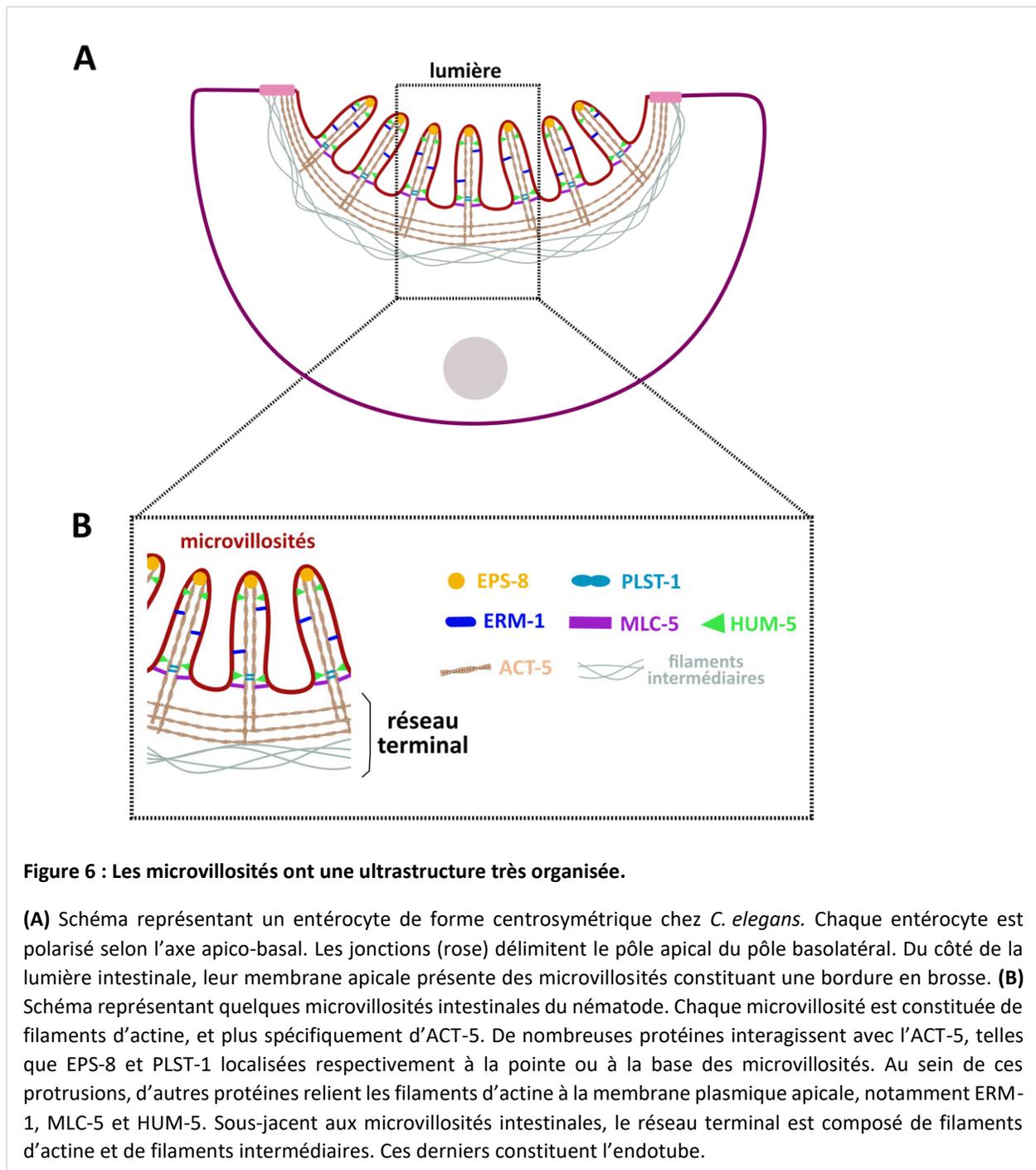
**Figure 5 : L'actine ACT-5, est essentielle à la formation des microvillosités chez *C. elegans*.**

**(A-B)** Observations de coupes transversales en microscopie électronique à transmission de la lumière intestinale. Images tirées de MacQueen *et al.*, 2005. **(A)** Dans les larves contrôles, les microvillosités sont visibles ainsi que le réseau terminal (TW : terminal web). **(B)** Au contraire, dans les larves déplétées en ACT-5, les microvillosités sont absentes de la membrane apicale mais le réseau terminal reste observable. Par ailleurs, la lumière intestinale devient arrondie après la déplétion d'ACT-5.

### iii. Les protéines interagissant avec l'actine au sein des microvillosités

Dans les années 1970, les études chez les vertébrés décrivant l'organisation des microvillosités ont révélé que ces dernières étaient essentiellement constituées par des filaments d'actine (Mooseker and Tilney 1975; MUKHERJEE and STAEHELIN 1971). Toutefois, basées sur des observations en MET, ces études ont également permis de révéler la présence de « ponts » reliant les filaments d'actine entre eux (*actin cross-linking proteins*). Ces ponts aideraient les filaments d'actine à s'agencer en un faisceau dense. En outre, d'autres ponts ont été mis en évidence et relient les filaments d'actine à la membrane plasmique des microvillosités (Mooseker and Tilney 1975; MUKHERJEE and STAEHELIN 1971). Depuis ces observations initiales, de nombreuses études ont démontré l'existence de multiples protéines

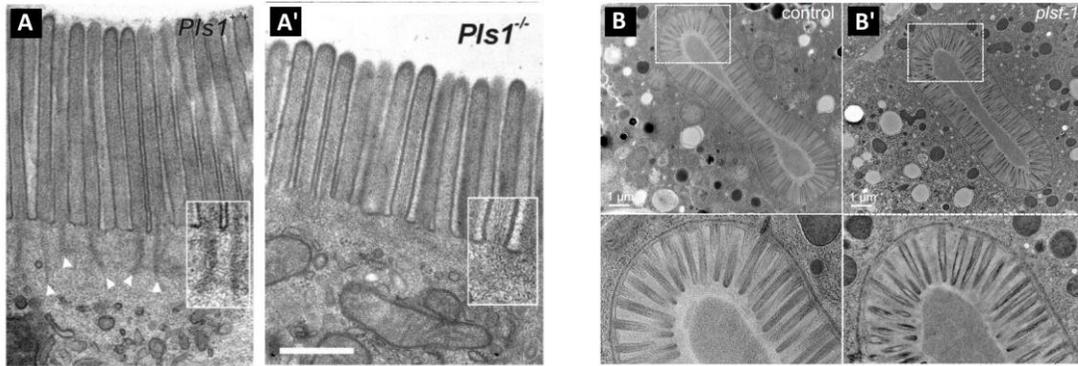
interagissant avec les filaments d'actine au sein des microvillosités afin de maintenir leur stabilité et leur morphologie (fig. 6).



## 1) Regroupant les filaments d'actine entre eux

Comme décrit ci-dessus, chaque microvillosité est constituée de plusieurs dizaines de filaments d'actine parallèles. Pour que la structure soit stable et solide, ces filaments d'actine sont reliés entre eux en un faisceau unique par des protéines interagissant avec l'actine (**fig. 6B** ; *bundling proteins*). Chez les vertébrés, trois protéines majeures exercent cette fonction de regroupement des filaments d'actine au sein des microvillosités intestinales. Il s'agit de la villine, l'espine et la plastine-1 (pour revues : (Delacour et al. 2016; Sauvanet et al. 2015)). Chez *C. elegans*, l'orthologue de la villine n'est pas localisé au niveau de la bordure en brosse intestinale (Hunt-Newbury et al. 2007). De plus, il n'existe pas d'orthologue de l'espine chez le nématode. En revanche, la protéine PLST-1 est l'orthologue de la plastine 1 chez *C. elegans*. La plastine-1, auparavant décrite sous le nom de fimbrine, possède deux sites de liaison à l'actine (de Arruda et al. 1990; Lin et al. 1994). Chaque site peut se lier à un filament d'actine. Ainsi, la plastine-1 est capable de relier les filaments d'actine entre eux à la base des microvillosités (**fig. 6B**). Cette fonction est calcium-dépendante (Bretscher and Weber 1980). En outre, la plastine-1 a également la capacité d'agir comme un connecteur entre les racines d'actine et les filaments intermédiaires du réseau terminal (Grimm-Günter et al. 2009). Les entérocytes de souris déficientes en *plastine-1* développent des microvillosités plus courtes et présentent une absence de racines d'actine en-dessous de la bordure en brosse (**fig. 7A,A'** ; (Grimm-Günter et al. 2009)). L'ancrage des microvillosités au sein du réseau terminal joue un rôle crucial afin de maintenir la stabilité de la bordure en brosse au cours du temps. En effet, l'absence de plastine-1 rend les microvillosités anormalement fragiles (Grimm-Günter et al. 2009). Toutefois, chez *C. elegans*, les larves mutantes *plst-1* ne présentent aucun défaut majeur de la polarité intestinale (**fig. 7B,B'** ; (Bidaud-Meynard et al. 2021)).

Une étude dans des modèles de cellules de mammifères suggère qu'une autre protéine pouvant relier des filaments d'actine, nommée filamine A, serait impliquée dans le contrôle du maintien de la bordure en brosse (Zhou et al. 2014). La protéine FLN-2, son orthologue chez *C. elegans*, a été également observée à la membrane apicale des entérocytes (Bidaud-Meynard et al. 2021).



**Figure 7 : La plastine-1 participe à la stabilité de la bordure en brosse chez les mammifères, mais pas chez *C. elegans*.**

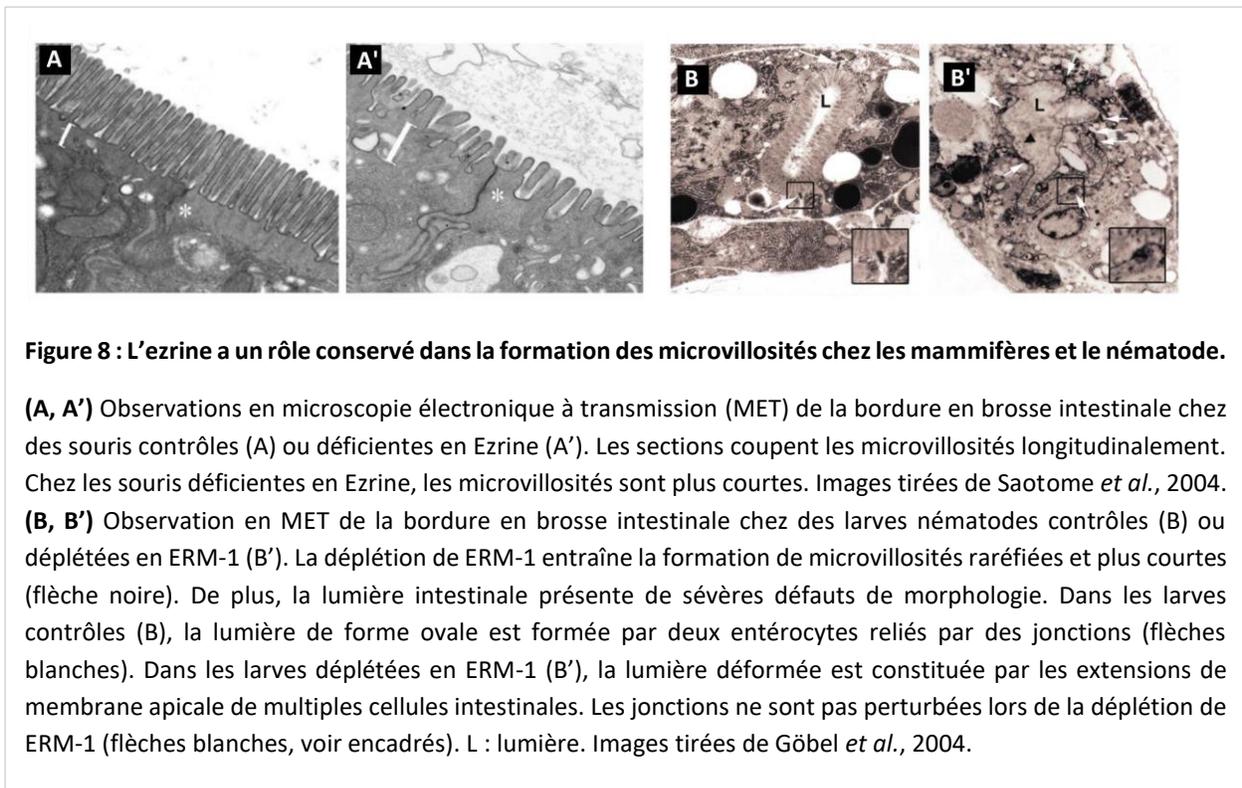
(A, A') Observations en microscopie électronique à transmission (MET) de la bordure en brosse intestinale chez des souris contrôles (A) ou déficientes en *Plst1* (A'). Les sections coupent les microvillosités longitudinalement. Chez les souris déficientes en *Pst1*, les microvillosités sont plus courtes. Au contraire des souris contrôles, les racines d'actine filamenteuse s'ancrant dans le réseau terminal sont absentes dans les souris *Plst1*<sup>-/-</sup> (voir encadrés). Barre d'échelle : 500 nm. Images tirées de Grimm-Günter *et al.*, 2009. (B, B') Observation en MET de la bordure en brosse intestinale chez des larves nématodes contrôles (B) ou mutantes pour *plst-1* (B'). La déplétion de PLST-1 n'entraîne pas de défaut majeur dans l'intestin. Barre d'échelle : 1  $\mu$ m. Images tirées de Bidaud-Meynard *et al.*, 2021.

## 2) Reliant l'actine à la membrane plasmique

Au sein des microvillosités, les filaments d'actine sont reliés entre eux comme présenté ci-dessus, mais également reliés latéralement à la membrane plasmique apicale (**fig. 6B**). Cet autre attachement de l'actine filamenteuse vise à soutenir la tension tout le long des protrusions apicales, et à stabiliser celles-ci au sein de la bordure en brosse. Ce rôle repose essentiellement sur la famille ERM (ezrine, radixine, moesine) et des myosines non conventionnelles.

Chez les vertébrés, l'ezrine est la seule protéine de la famille Ezrine/Radixine/Moesine à être exprimée dans les entérocytes (Berryman, Franck, and Bretscher 1993; Bretscher 1983). Elle est localisée sur toute la longueur des microvillosités. D'un point de vue fonctionnel, l'ezrine est essentielle à la formation des microvillosités et à l'intégrité de la bordure en brosse (Saotome, Curto, and McClatchey 2004). Les souris mutantes pour l'ezrine montrent de nombreuses anomalies de l'ultrastructure de la bordure en brosse telles que des microvillosités plus petites et présentes en plus faible nombre à la membrane apicale (**fig. 8A,A'**). De plus, leur réseau terminal est désorganisé comparé aux souris contrôles (Saotome *et al.* 2004). D'un point de structurel, l'ezrine comporte différents domaines. En N-terminal, le

domaine FERM est responsable de la liaison de l'ézrine à la membrane plasmique, notamment aux lipides membranaires PI(4,5)P2. En C-terminal, le domaine C-ERMAD interagit quant à lui avec l'actine filamentueuse (pour revues : (Crawley, Mooseker, et al. 2014; Sauvanet et al. 2015)). Dans le cytoplasme des entérocytes, l'ézrine est maintenue dans une forme inactive avec une conformation « fermée » induite par l'interaction entre le domaine N-terminal FERM et le domaine C-terminal C-ERMAD. Elle est alors incapable de lier les filaments d'actine et la membrane plasmique (Gary and Bretscher 1995). La liaison aux PI(4,5)P2 par le domaine FERM ainsi que la phosphorylation du résidu conservé Thréonine 567 induit un changement de conformation de l'ézrine. Celle-ci s'ouvre, devient dès lors active et ainsi capable de lier la membrane plasmique au cytosquelette d'actine filamentueuse au sein des microvillosités (pour revue : (Sauvanet et al. 2015)). Dans les microvillosités matures, l'ézrine subit constamment un cycle de phosphorylation/déphosphorylation. Enrichie à la pointe des microvillosités, la forme active phosphorylée de l'ézrine ne persiste environ que 2 minutes avant d'être déphosphorylée (Viswanatha et al. 2012).



Le génome de *C. elegans* n'encode qu'un seul orthologue de la famille ERM, appelé ERM-1, dont la séquence et la composition des domaines sont très similaires à celles de l'ézrine chez l'être humain (Sepers et al. 2022). De façon similaire aux mammifères, ERM-1 est enrichie à la surface apicale des

entérocytes, et plus spécifiquement, tout le long des microvillosités (**fig. 6A-B** ; (Bidaud-Meynard et al. 2021; van Fürden et al. 2004; Göbel et al. 2004)). La déplétion de ERM-1 réduit l'enrichissement apical du cytosquelette d'ACT-5 dans les entérocytes (Bernadskaya et al. 2011; van Fürden et al. 2004). Ce phénotype est associé à la présence de moins de microvillosités qui sont également plus petites au pôle apical (**fig. 8B,B'** ; (Göbel et al. 2004)), comme cela a été décrit chez la souris. De plus, les larves déplétées en ERM-1 présentent des défauts majeurs de la morphologie de la lumière intestinale avec des obstructions intestinales, induisant une létalité larvaire (**fig. 8B,B'** ; (van Fürden et al. 2004; Göbel et al. 2004)). En résumé, ERM-1 est un composant de la bordure en brosse essentielle pour maintenir l'intégrité de cette dernière, mais aussi pour assurer une architecture correcte du tissu intestinal et de sa lumière. Récemment, il a été décrit que la fonction de ERM-1 au niveau des microvillosités dépend essentiellement de sa capacité à se lier aux phospholipides membranaires (Ramalho et al. 2020). La phosphorylation du résidu thréonine au sein de son domaine C-terminal module quant à elle la localisation apicale de ERM-1 et sa dynamique moléculaire au sein de la bordure en brosse (Ramalho et al. 2020).

Chez les vertébrés, d'autres protéines permettent de relier la membrane plasmique apicale aux filaments d'actine situés dans les microvillosités. Il s'agit notamment de la myosine 1a, une myosine non conventionnelle. Les souris déficientes en *Myo1a* montrent des altérations de la bordure en brosse avec des microvillosités fusionnées, des extensions membranaires ainsi que la perte de l'organisation hexagonale des microvillosités (Tyska et al. 2005). La *Myo1a* agit en parallèle d'autres myosines telles que *Myo1c* et *Myo1d* (Benesh et al. 2010; Tyska et al. 2005). Par ailleurs, une deuxième myosine non conventionnelle, la myosine-6, permet également l'interaction membrane-cytosquelette d'actine au sein de la bordure en brosse. Il s'agit du seul moteur dirigé vers l'extrémité (-) des filaments d'actine, donc vers le réseau terminal (Wells et al. 1999). Dans les entérocytes, *Myo6* est localisée au niveau de la région du réseau terminal, où il relie la membrane plasmique aux racines des filaments d'actine. La perte de la *Myo6* chez la souris entraîne une fusion de microvillosités adjacentes, de façon similaire à la perte de *Myo1a* (Hegan et al. 2012).

Chez *C. elegans*, deux myosines non conventionnelles ont été récemment décrites comme étant exprimées dans les entérocytes du nématode (Bidaud-Meynard et al. 2021). Il s'agit de HUM-5, la chaîne lourde d'une myosine non conventionnelle et l'orthologue des myosines 1d/1g chez l'être humain (Baker and Titus 1997; Bidaud-Meynard et al. 2021). Dans l'intestin, HUM-5 est exprimée à la pointe mais aussi à la base des microvillosités (**fig. 6B** ; (Bidaud-Meynard et al. 2021)). Toutefois, son rôle dans cette structure n'a pas encore été déterminé. Par ailleurs, MLC-5, la chaîne légère de la myosine essentielle, orthologue

de la MYL1/6 chez l'être humain est également exprimée dans l'intestin du nématode (Bidaud-Meynard et al. 2021; Gally et al. 2009). Il a été montré que MLC-5 joue un rôle crucial lors du développement embryonnaire du nématode. Elle permet à la myosine II d'interagir avec les filaments d'actine dans l'épiderme et est de ce fait essentielle à l'élongation embryonnaire (Gally et al. 2009). MLC-5 est localisée à la base des microvillosités chez *C. elegans* (**fig. 6B** ; (Bidaud-Meynard et al. 2021)). Comme HUM-5, sa fonction intestinale n'a toutefois pas encore été décrite.

### 3) Régulant la taille des microfilaments d'actine

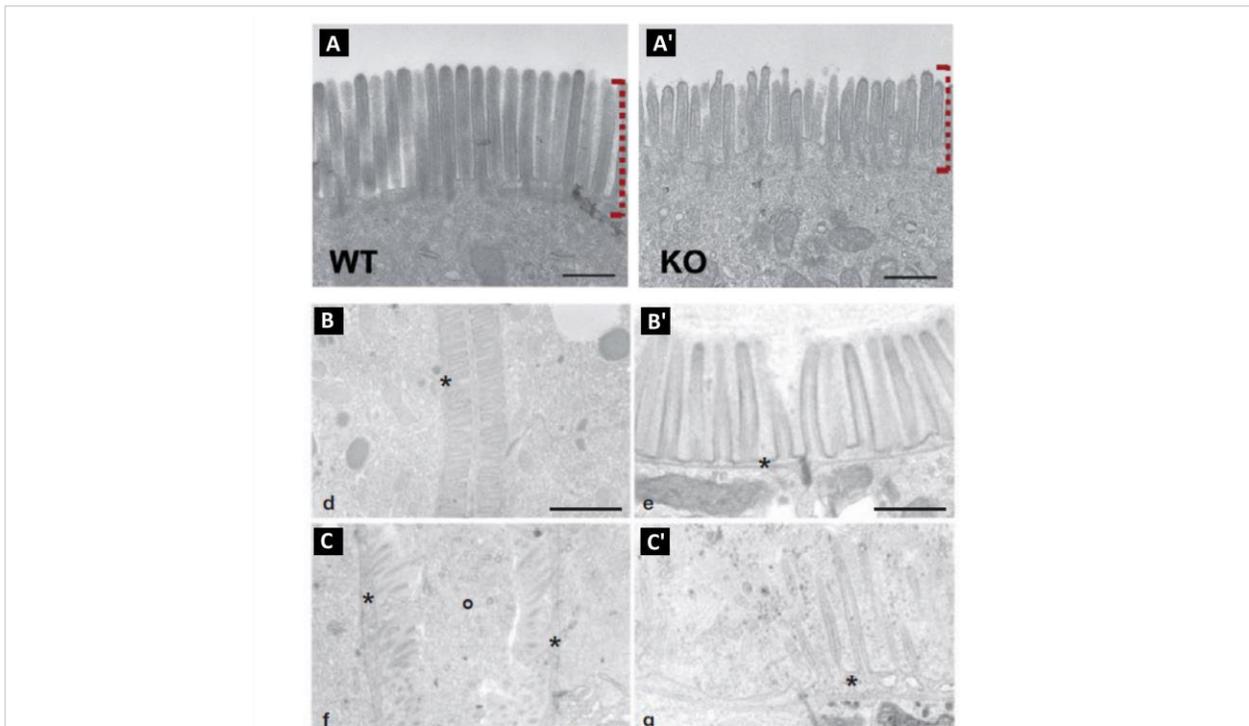
Au cours d'un développement intestinal normal, la bordure en brosse intestinale apparaît comme étant une structure très régulière, assemblée de microvillosités de taille similaire. En 1970, une zone dense aux électrons localisée à la pointe des protrusions apicales des entérocytes a été identifiée (**fig. 3C** ; (Mooseker and Tilney 1975; Tilney and Cardell 1970)). La composition de cette structure reste encore assez peu caractérisée actuellement.

En 2004, une étude chez *C. elegans* a révélé la présence de la protéine EPS-8 enrichie spécifiquement à la pointe des microvillosités (Croce et al. 2004). Cette protéine est essentielle pour maintenir l'intégrité des microvillosités. Chez *C. elegans*, il existe deux isoformes de EPS-8 produites par épissage alternatif : une forme longue (EPS-8A) et une forme courte (EPS-8B) qui ne comporte pas la région C-terminale de la protéine, permettant l'interaction avec l'actine (Croce et al. 2004). L'inactivation du gène *eps-8*, et donc la déplétion des deux formes EPS-8A et EPS-8B, induit une létalité embryonnaire et larvaire (Croce et al. 2004). Toutefois, seule la fonction de EPS-8A, et non pas celle de EPS-8B, est essentielle au sein du tissu intestinal. La déplétion de EPS-8A entraîne la formation d'une bordure en brosse irrégulière, avec une densité globale diminuée et une absence de microvillosités dans certaines zones de l'intestin (**fig. 9C,C'** ; (Croce et al. 2004)). De plus, dans ce contexte, les protrusions apicales ne se développent plus de manière strictement perpendiculaire au réseau terminal sous-jacent (Croce et al. 2004). Ce phénotype pourrait être expliqué par une rigidité diminuée des microvillosités, qui n'a pas été démontrée. En outre, la déplétion de EPS-8A entraîne également une altération de la régulation de la longueur des microvillosités (**fig. 9C,C'**). Ces dernières adoptent une longueur très variable au sein de la bordure en brosse et sont en moyenne plus longues par comparaison aux contrôles (Croce et al. 2004).

Ce rôle de Eps8 dans la formation de la bordure en brosse a été confirmé dans des modèles de cellules de mammifères (Zwaenepoela et al. 2012). Par ailleurs, les souris déficientes en Eps8 développent

des microvillosités désorganisées et plus courtes (**fig. 9A,A'** ; (Tocchetti et al. 2010)). Ainsi, EPS-8 joue un rôle essentiel dans la régulation de la taille des microvillosités intestinales.

*In vitro*, EPS-8 exerce une fonction double : elle permet de regrouper des filaments d'actine en faisceau mais a également une activité de coiffe des extrémités barbues (**fig. 3D** ; (Croce et al. 2004; Hertzog et al. 2010)). Chez *C. elegans*, son activité de EPS-8A dans le regroupement des filaments d'actine en faisceau apparaît comme étant essentielle pour la formation correcte des microvillosités, tandis que son activité de coiffe ne semble pas requise dans l'intestin du nématode (Croce et al. 2004; Hertzog et al. 2010).



**Figure 9 : La protéine EPS-8 régule la taille des microvillosités au sein de la bordure en brosse intestinale chez les mammifères et le nématode.**

**(A, A')** Observations en microscopie électronique à transmission (MET) de la bordure en brosse intestinale chez des souris contrôles (A) ou déficientes en Eps8 (A'). Les sections coupent les microvillosités longitudinalement. Chez les souris déficientes en Eps8, les microvillosités sont plus courtes. Images tirées de Tocchetti *et al.*, 2010.

**(B-C')** Observation en MET de la bordure en brosse intestinale chez des larves nématodes contrôles (B, B') ou déplétées en EPS-8A (C, C'). La déplétion de EPS-8A entraîne la formation de microvillosités de forme irrégulière et raréfiées au sein de la bordure en brosse par rapport aux contrôles. De plus, la lumière intestinale s'élargit et la distance entre les membranes apicales de chaque entérocyte, marquées par (\*), augmente. Les astérisques noirs indiquent également le réseau terminal. Images tirées de Croce *et al.*, 2004.

#### iv. Le réseau terminal et l'endotube

Les microfilaments d'actine formant les microvillosités s'ancrent au niveau d'une structure subapicale du cytosquelette. Cette dernière est formée par les racines des faisceaux d'actine parallèles provenant des protrusions apicales des entérocytes, mais aussi par un ensemble de filaments orientés perpendiculairement aux microvillosités (Hirokawa et al. 1982; Mooseker and Tilney 1975; MUKHERJEE and STAEHELIN 1971). Cette structure a été nommée réseau terminal (*terminal web*). Le réseau terminal a été observé dès les premières analyses de l'ultrastructure de la polarité apicale des entérocytes chez les vertébrés (Mooseker and Tilney 1975; MUKHERJEE and STAEHELIN 1971). Il est constitué de différentes couches de cytosquelette de différentes natures. Sous-jacent aux microvillosités, ce réseau hétérogène procure une stabilisation structurale et mécanique de toute la bordure en brosse (Fath, Mamajiwalla, and Burgess 1993). Sa forte densité de cytosquelette en fait une région cytoplasmique sans organelles visible en microscopie électronique (Mooseker 1985).

Chez les vertébrés, les racines des filaments d'actine parallèles issus des microvillosités sont reliées entre elles par des réseaux protéiques constitués de spectrine, de tropomyosine et de myosine II (Fath et al., 1993). En outre, les racines des filaments d'actine microvillositaire sont ancrées dans un réseau de microfilaments d'actine, perpendiculaire aux microvillosités. En subapical de ce celui-ci, il existe un réseau de filaments intermédiaires, (**fig. 10A**; (Fath et al. 1993)). Les filaments intermédiaires peuvent être formés par de multiples polypeptides différents. Les kératines simples sont groupées ensemble avec d'autres kératines pour former le premier groupe d'assemblage des filaments intermédiaires. Par la suite, les kératines de type I s'assemblent avec des kératines de type II afin de former *in fine* des hétérodimères (pour revue : (Coch and Leube 2016)). Ces derniers s'associent ensuite antiparallèlement pour former des tétramères, l'unité d'assemblage des filaments intermédiaires. Les étapes suivantes d'assemblage de tétramères pour former des filaments intermédiaires matures ne sont que partiellement caractérisées. Huit tétramères s'associent latéralement pour former des filaments de longueur d'environ 60 nm. Ensuite, ces filaments s'attachent longitudinalement, s'allongeant pour former des filaments intermédiaires de 10 nm (pour revue : (Coch and Leube 2016)).

Le réseau de filaments intermédiaires intestinaux est principalement composé des cytokératines KRT8 (*keratin 8*), KRT18, KRT19 et KRT20 dans des entérocytes humains complètement différenciés (Moll et al. 1993; Salas 1999). Dans des cellules intestinales en culture, la déplétion de KRT19 induit des défauts sévères de la formation de la bordure en brosse, formée alors de microvillosités courtes et éparées (Salas

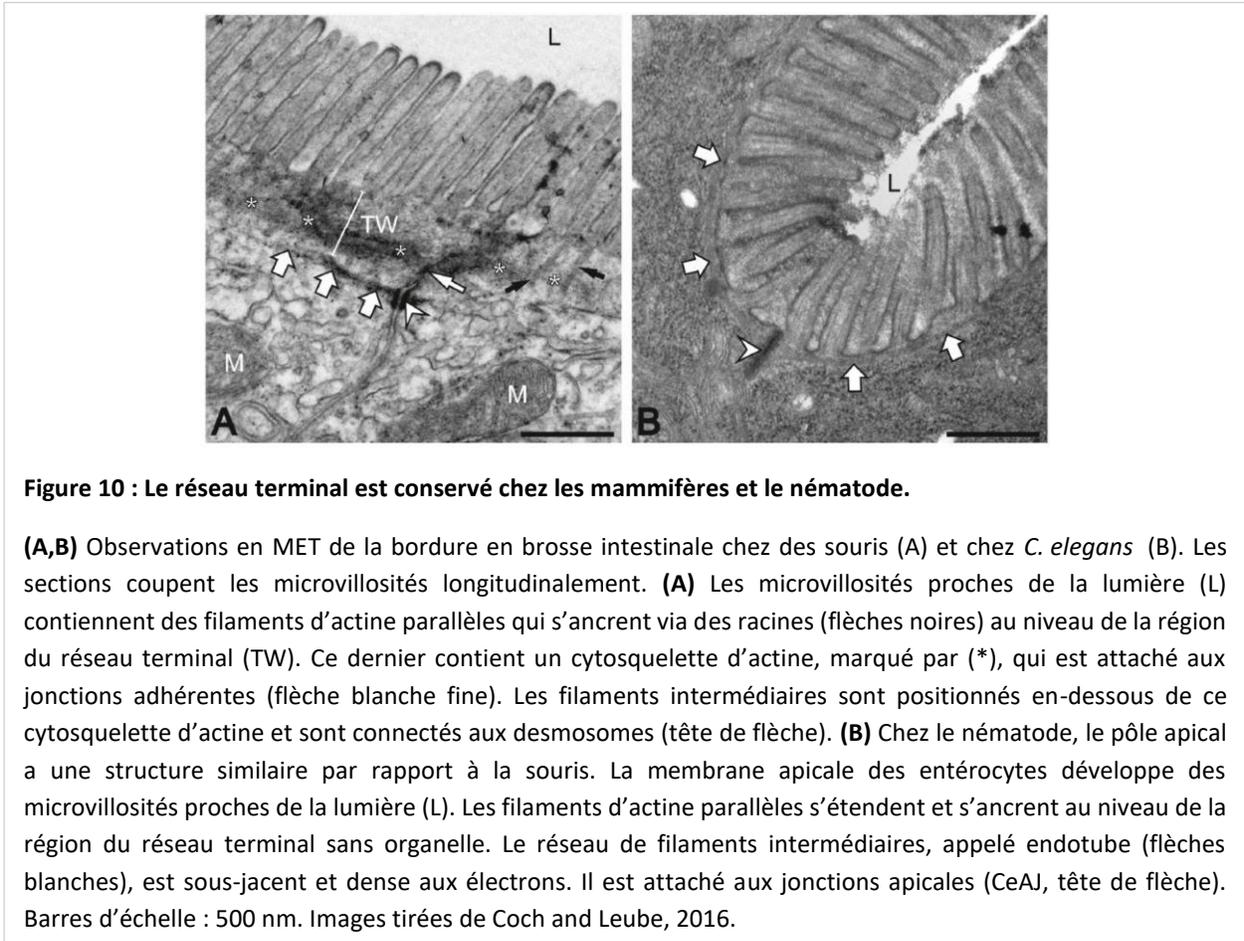
et al. 1997). En outre, les souris déficientes en KRT8 présentent les mêmes défauts intestinaux (Ameen, Figueroa, and Salas 2001).

Comme les microvillosités, l'arrangement de cette région subapicale est conservé chez *C. elegans* (**fig. 10B** ; (Bossinger et al. 2004)). Ainsi, le réseau terminal est formé de microfilaments d'actine et des filaments intermédiaires sous-jacents. Chez le nématode, ce réseau est particulièrement riche en filaments intermédiaires et constitue une couche subapicale dense aux électrons, observable facilement en MET (**fig. 10B** ; (Bossinger et al. 2004)). Il est nommé « endotube » (Munn E.A. and Greenwood C.A. 1984). Ce dernier organise le domaine subapical des entérocytes puisqu'il sépare la région du réseau terminal qui ne présente pas d'organelle du cytoplasme plus basal. Le génome de *C. elegans* encode 11 polypeptides de filaments intermédiaires différents. Six d'entre eux sont exprimés dans l'intestin (Geisler et al. 2020; Karabinos, Schünemann, and Weber 2004). Il s'agit de IFB-2, IFC-1, IFC-2, IFD-1, IFD-2 et IFP-1 (pour revues : (Carberry et al. 2009; Coch and Leube 2016)). Ils sont tous uniformément présents tout le long du tube intestinal, plus spécifiquement au niveau de l'endotube (Geisler et al. 2016).

Plusieurs études ont démontré que IFB-2 exerce un rôle essentiel pour la formation de l'endotube (Bossinger et al. 2004; Geisler et al. 2019, 2020). En effet, des observations chez des mutants *ifb-2(null)* en MET ont mis en évidence une absence totale d'endotube. L'absence de IFB-2 induit également des défauts mineurs de la morphologie de la lumière intestinale qui s'élargit localement le long de l'intestin (Geisler et al. 2020). En revanche, les microvillosités des nématodes *ifb-2(null)* se forment normalement pour la majorité d'entre elles, malgré des défauts mineurs et ponctuels de désorganisation au sein de la bordure en brosse (Geisler et al. 2020). De plus, les faisceaux d'actine au sein des microvillosités s'enfoncent correctement dans le cytoplasme apical avec leurs racines caractéristiques (Geisler et al. 2019, 2020). Enfin, les jonctions apparaissent normales dans ce contexte.

Par ailleurs, le rôle de IFC-2 a également été décrypté (Geisler et al. 2020; Hüsken et al. 2008). Les mutants *ifc-2(null)* présentent une structure dense aux électrons similaire à l'endotube. Toutefois, l'endotube a été décrit comme plus fin que les vers sauvages, et se montre même absent localement (Geisler et al. 2020). Les microvillosités dans les mutants *ifc-2(null)* adoptent une morphologie globale normale, même si de nombreuses irrégularités d'espacement des microvillosités au sein de la bordure en brosse sont visibles (Geisler et al. 2020). Une lumière intestinale élargie est fréquemment observée en absence de IFC-2 (Geisler et al. 2020; Hüsken et al. 2008). Cependant, ce phénotype n'est pas associé à des défauts d'intégrité des jonctions (Hüsken et al. 2008). Par contre, les mutants *ifc-2(null)* subissent une

diminution de l'enrichissement apical d'IFB-2 (Geisler et al. 2020). Ainsi, IFC-2 participe à l'établissement de l'endotube.

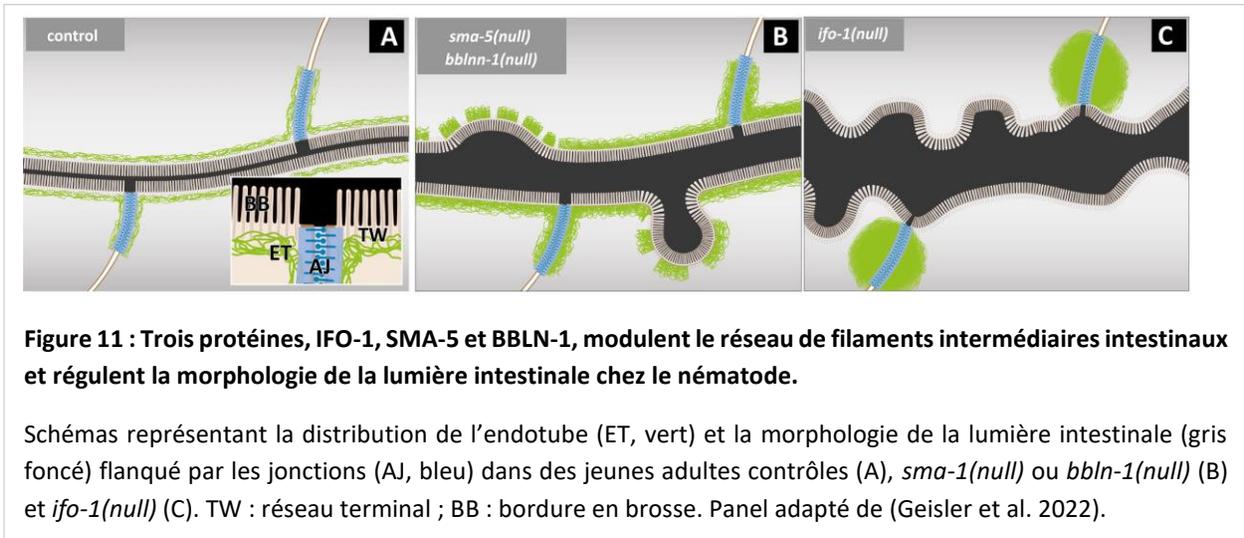


Les fonctions respectives des quatre autres polypeptides intestinaux chez *C. elegans* ont été aussi analysées. La perte de fonction de IFC-1, IFD-1, IFD-2 ou IFP-1 n'entraîne pas de défaut de la distribution de IFB-2 (Geisler et al. 2020). Au contraire des trois autres pertes de fonction qui ne présentent aucun défaut de la morphologie de la lumière intestinale, les mutants *ifd-2(null)* développent une lumière élargie ainsi que des invaginations cytoplasmiques (Geisler et al. 2020).

Pour résumer, sur les six polypeptides de filaments intermédiaires exprimés dans l'intestin du nématode, seuls deux d'entre eux sont nécessaires à la formation de l'endotube, IFC-2 et IFB-2, ce dernier s'avérant être un acteur central dans ce processus. Par ailleurs, l'observation d'une lumière élargie dans

les mutants *ifb-2(null)*, *ifc-2(null)* et *ifd-2(null)* suggèrent un rôle de ces filaments intermédiaires dans le maintien de la morphologie de la lumière intestinale.

Par ailleurs, trois protéines, IFO-1, SMA-5 et BBLN-1 régulent également la formation du réseau de filaments intermédiaires (**fig. 11** ; (Carberry et al. 2012; Geisler et al. 2016; Rimmelzwaal et al. 2021)). Ces protéines sont elles-mêmes localisées au niveau de l'endotube, associées aux filaments intermédiaires.



Le premier régulateur du cytosquelette de filaments intermédiaires intestinaux à avoir été mis en évidence chez *C. elegans* est la protéine IFO-1 (*intermediate filament organizer*) (**fig. 11C** ; (Carberry et al. 2012)). Le réseau de filaments intermédiaires dans les mutants *ifo-1(null)* est très altéré, IFO-1 ne s'organise plus en endotube, mais en agrégats s'accumulant principalement aux jonctions et ponctuellement dans le cytoplasme (**fig. 11C** ; (Carberry et al. 2012)). Dans ces mutants, les entérocytes forment des microvillosités, mais la bordure en brosse est irrégulière et la lumière intestinale élargie (Carberry et al. 2012). Ainsi, IFO-1 est essentielle pour la formation correcte du réseau de filaments intermédiaires intestinaux.

Un autre modulateur des filaments intermédiaires intestinaux est SMA-5. Il s'agit de l'orthologue de la MAP (*mitogen-activated protein*) kinase 7 (Watanabe et al., 2005). Dans les mutants *sma-5(null)*, de nombreuses invaginations cytoplasmiques de la membrane plasmique apicale apparaissent à l'âge adulte, s'aggravant au fil du temps (**fig. 11B** ; (Geisler et al. 2016)). Ces déformations membranaires sont associées avec le développement d'un endotube localement épaissi, constitué de cytosquelette amorphe, à côté de

zones présentant une perte complète de l'endotube (**fig. 11B** ; (Geisler et al. 2016)). IFB-2 est toujours présent mais de manière discontinue. En outre, les entérocytes développent des microvillosités qui forment cependant une bordure en brosse irrégulière (Geisler et al. 2016). Enfin, une augmentation de la phosphorylation des filaments intermédiaires a été détectée dans les mutants *sma-5(null)*. Ce résultat suggère que la perte de fonction de SMA-5 réduit la stabilité du tube intestinal du fait d'une altération de la phosphorylation du réseau de filament intermédiaire (Geisler et al. 2016).

Récemment, un troisième type de régulateur des filaments intermédiaires intestinaux a été décrit. Il s'agit de la protéine BBLN-1 (*bulges budding from the intestinal lumen* ; (Rommelzwaal et al. 2021)). La déplétion de BBLN-1 induit un phénotype intestinal très similaire à ce qui a été observé dans l'intestin des mutants *sma-5(null)* (**fig. 11B** ; (Geisler et al. 2016)). En effet, les mutants *bbln-1(null)* présentent des invaginations cytoplasmiques de la membrane plasmique apicale en forme de « bulles » (Rommelzwaal et al. 2021). Comme cela a été précédemment décrit dans les mutants *sma-5(null)*, l'endotube des mutants *bbln-1(null)* est absent ou fortement réduit dans les régions d'invaginations cytoplasmiques tandis qu'il s'épaissit à la base de ces invaginations (**fig. 11B** ; (Rommelzwaal et al. 2021)). En revanche, la localisation de IFB-2, IFC-2 et IFC-2 ne semble pas affectée. Par ailleurs, les microvillosités se forment correctement même dans les régions de déformations membranaires. Tous ces résultats suggèrent que BBLN-1 est requise pour le maintien de l'intégrité du réseau de filaments intermédiaires mais sans agir sur le recrutement des filaments intermédiaires au pôle subapical (Rommelzwaal et al. 2021)).

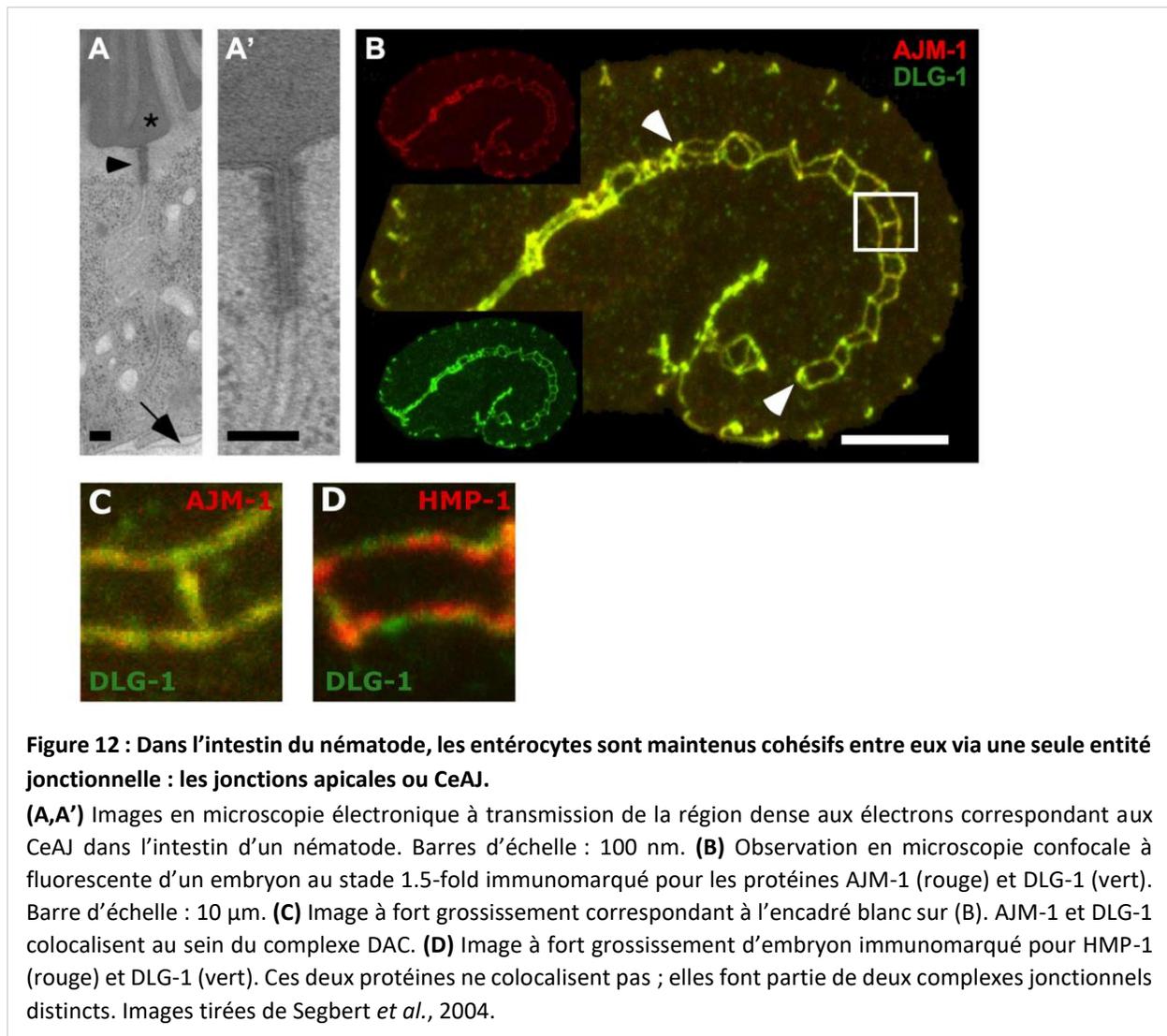
#### v. Les jonctions apicales

Comme toutes les cellules constituant un épithélium, les entérocytes sont très cohésifs entre eux, reliés par des jonctions. Chez les vertébrés, trois types de jonctions assurent la cohésion de l'épithélium et régulent sa fonction de barrière : les jonctions serrées (ou *tight junctions*) les plus apicales, les jonctions adhérentes (ou *adherens junctions*) et les desmosomes plus basaux. Chez la drosophile, les jonctions adhérentes sont le complexe jonctionnel localisé le plus proche du pôle apical. Il existe également les jonctions septées (ou *septate junctions*) (pour revue : (Rodriguez-Boulan and Macara 2014)).

Au contraire des vertébrés et de la drosophile, les jonctions des cellules épithéliales chez le nématode forment une seule région dense aux électrons délimitant le pôle apical et le domaine basolatéral (**fig. 12,13** ; (Leung et al. 1999; Segbert et al. 2004)). En microscopie confocale à fluorescence, elles se distinguent par leur motif d'échelle très caractéristique (**fig. 12B**). Elles se nomment les « *C. elegans apical junction* » ou « CeAJ » (McMahon et al. 2001). J'utiliserai donc ce terme par la suite. Même si elles

constituent un ensemble jonctionnel unique, les CeAJ sont composées de deux complexes ayant des rôles distincts (**fig. 12B-D,13**).

La partie apicale des CeAJ, appelée « *cadherin-catenin complex* » ou « CCC », correspond aux jonctions adhérentes. Comme chez les vertébrés, ce complexe se constitue des protéines HMR-1, HMP-1 et HMP-2, respectivement orthologues de la E-cadhérine, de l' $\alpha$ -caténine et de la  $\beta$ -caténine chez *C. elegans* (**fig. 13B** ; (Costa et al. 1998)). Il permet l'ancrage aux jonctions des filaments d'actine. Les protéines HMR-1, HMP-1 et HMP-2 ont été mises en évidence en premier dans l'épiderme. En effet, la déplétion de chacune de ces protéines entraîne des défauts de morphologie et d'élongation de l'embryon *C. elegans* (Costa et al. 1998). Le rôle des protéines constitutives du CCC est similaire à celui de leurs orthologues. Ainsi, les protéines HMR-1 exprimées par deux cellules épithéliales distinctes interagissent entre elles grâce à leur domaine extracellulaire, HMP-1 relie le complexe jonctionnel aux filaments d'actine



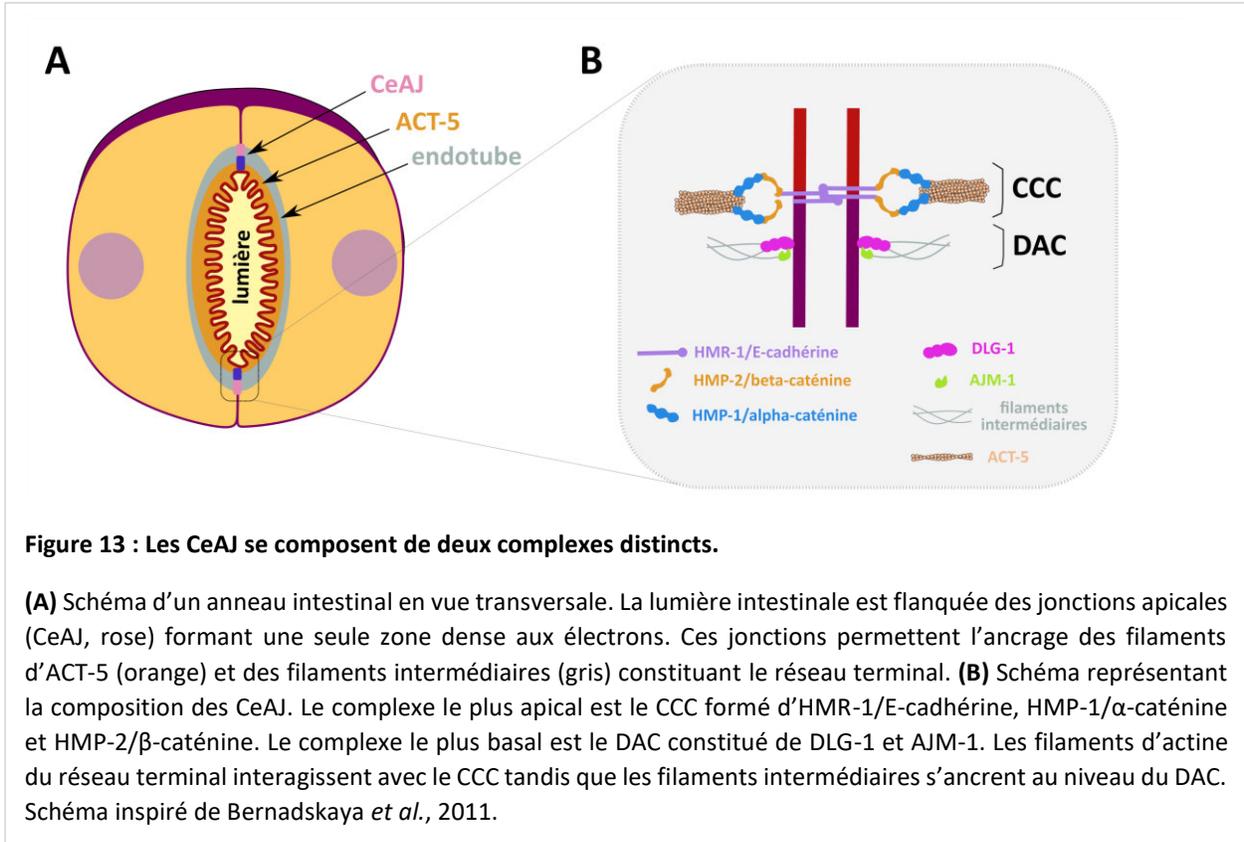
et HMP-2 fait le lien entre le domaine cytoplasmique de HMR-1 et HMP-1 (**fig. 13B** ; (Costa et al. 1998)). Cette organisation induit une forte cohésion entre les entérocytes. De plus, en ancrant le cytosquelette d'actine au niveau des jonctions apicales, le CCC transmet les forces mécaniques responsables de l'élongation embryonnaire (Vuong-Brender, Yang, and Labouesse 2016). Toutefois, la déplétion d'un seul composant du CCC ne perturbe pas la polarité épithéliale ou la formation de la région de la CeAJ dense aux électrons (Bossinger et al. 2004; Costa et al. 1998).

Le second complexe constituant les CeAJ, basal au CCC, contient les protéines AJM-1 et DLG-1, orthologue de *Discs large* chez la drosophile (**fig. 12B-D,13B** ; (Bossinger et al. 2001; Firestein and Rongo 2001; Köppen et al. 2001; McMahon et al. 2001)). Il est nommé « DAC » et permet l'ancrage des filaments intermédiaires du réseau terminal. Les protéines AJM-1 et DLG-1 sont importantes pour le bon déroulement de l'élongation embryonnaire et de la morphogénèse (Firestein and Rongo 2001; Köppen et al. 2001). Dans l'épithélium intestinal, il a été décrit que AJM-1 et DLG-1 interagissent physiquement et que DLG-1 est nécessaire pour la localisation de AJM-1 aux jonctions apicales (**fig. 12B,13B** ; (Bossinger et al. 2001; Köppen et al. 2001; McMahon et al. 2001)). En revanche, les protéines du CCC ne sont pas requises pour la localisation de DLG-1 (Firestein and Rongo 2001). La déplétion de DLG-1 affecte la mise en place des régions jonctionnelles denses aux électrons qui ne sont alors plus visibles en MET (McMahon et al. 2001). Toutefois, la déplétion de DLG-1 ou de AJM-1 ne perturbe pas la polarité intestinale globale (Bossinger et al. 2001, 2004; Köppen et al. 2001; Segbert et al. 2004).

Alors que la déplétion seule de composants du CCC ou du DAC ne suffit pas à perturber la polarité intestinale, la déplétion simultanée des composants du CCC et du DAC induit de sévères défauts de polarité intestinale (Segbert et al. 2004). Ainsi, ces deux complexes permettent ensemble de maintenir la polarité apico-basale des entérocytes et de délimiter les deux pôles cellulaires.

Par ailleurs, les deux complexes protéiques des CeAJ ont été décrits comme étant capables de réguler l'enrichissement apical d'actine filamenteuse constituant le réseau terminal des entérocytes (Bernadskaya *et al.*, 2011). Ils le font en interaction avec le complexe Arp2/3 (*Actin Related Protein 2/3*). Ce dernier promeut la formation d'actine branchée en nucléant de nouveaux polymères d'actine sur les filaments d'actine existants (pour revue : (Chhabra and Higgs 2007)). Il est activé par le complexe WAVE/Scar. Ainsi, dans les stades larvaires et adultes, la déplétion des protéines jonctionnelles DLG-1 ou HMR-1 mais également celle des protéines des complexes Arp2/3 ou WAVE/Scar entraîne l'apparition d'une lumière intestinale élargie. Ce phénotype est associé à une diminution des niveaux d'actine filamenteuse apicale dans les entérocytes (Bernadskaya et al. 2011). En outre, Arp2/3 et WAVE/Scar sont

capables de réguler respectivement l'enrichissement de DLG-1 et HMR-1 au niveau des CeAJ dans les adultes (Bernadskaya et al. 2011; Cordova-Burgos, Patel, and Soto 2021). De plus, les niveaux apicaux d'actine filamenteuse sont corrélés avec les niveaux protéiques de DLG-1 (Bernadskaya et al. 2011). Ainsi, les CeAJ interagissent avec le complexe Arp2/3 et WAVE/Scar afin de maintenir le réseau terminal des cellules intestinales.



## vi. Le domaine basolatéral

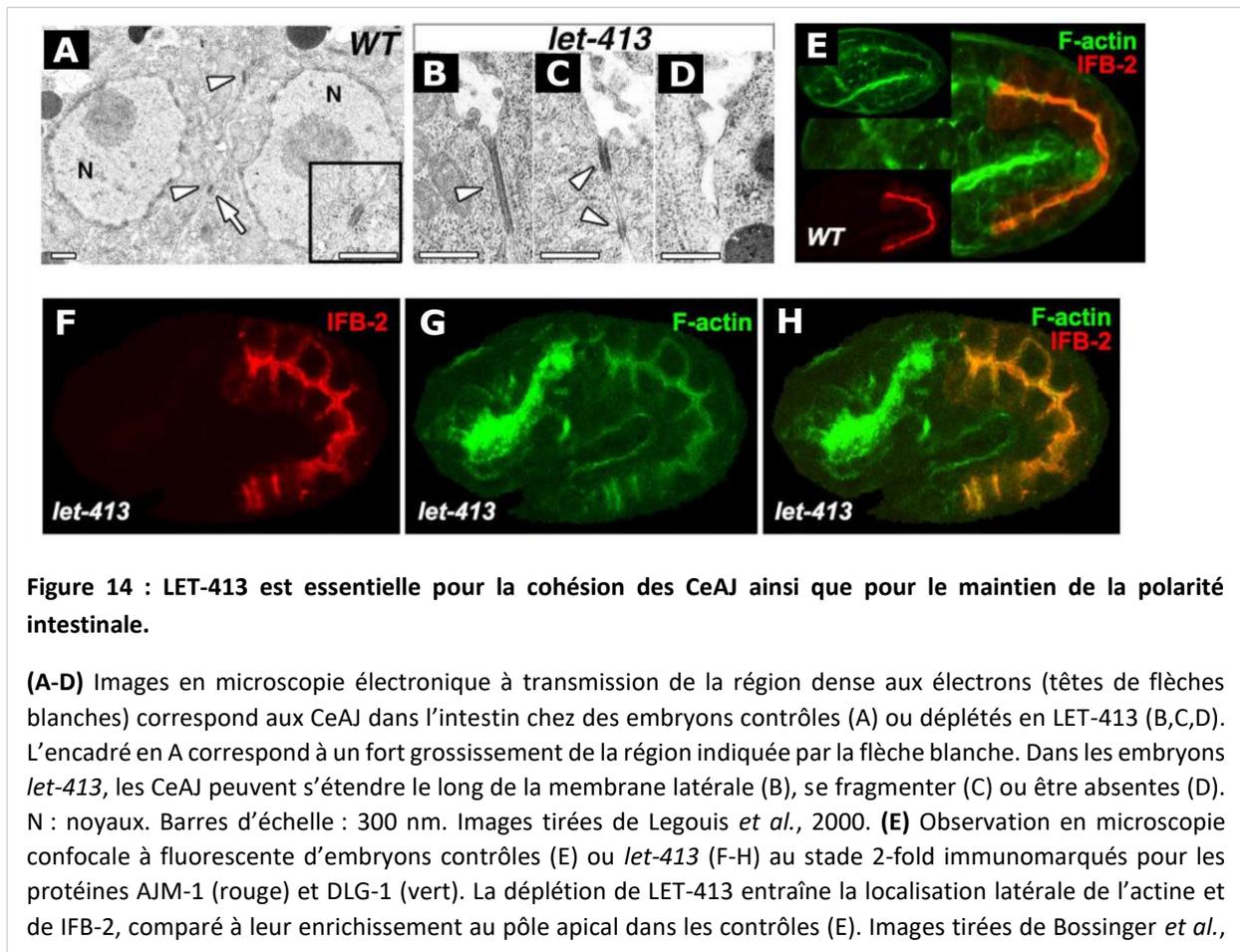
Ainsi, les jonctions permettent de délimiter le pôle apical de la membrane basolatérale. De la même manière que le module PAR-3/PAR-6/PKC-3 détermine le pôle apical des cellules intestinales, la protéine LET-413 agit en tant que déterminant de polarité basolatérale (Legouis et al. 2000; McMahon et al. 2001). Il s'agit de l'homologue de la protéine Scribble chez la drosophile. LET-413 est localisée uniformément le long de la membrane basolatérale des cellules épithéliales du nématode, notamment des entérocytes (Legouis et al. 2000; McMahon et al. 2001). Exclu de la membrane apicale, sa localisation devient visible le long de la membrane basolatérale à partir des CeAJ. Au cours du développement embryonnaire chez *C. elegans*, la déplétion de LET-413 induit de sévères défauts des trois tissus épithéliaux

principaux (épiderme, pharynx, intestin) (Legouis et al. 2000). En effet, les embryons mutants *let-413(null)* ne subissent pas une élongation embryonnaire complète. De plus, la morphogenèse de leur pharynx est anormale et leur intestin ne présente pas de lumière visible (Bossinger et al. 2004; Legouis et al. 2000). Ainsi, LET-413 exerce un rôle essentiel dans tous les tissus épithéliaux du nématode.

Dans l'intestin, la déplétion de LET-413 perturbe la polarité apico-basale des entérocytes. Alors qu'ils sont enrichis au pôle apical des entérocytes dans les embryons contrôles, PAR-3, PAR-6 et PKC-3 deviennent progressivement localisés le long de la membrane latérale dans les embryons mutants *let-413(null)* (Legouis et al., 2000 ; McMahon et al., 2001). Une caractérisation plus approfondie du phénotype des mutants *let-413(null)* a également mis en évidence de sévères défauts des CeAJ. Dans les embryons contrôles, les jonctions apicales intestinales denses aux électrons sont bien définies spatialement et localisées à proximité de la membrane apicale. Au contraire, dans les embryons mutants *let-413(null)*, les CeAJ s'étendent, deviennent discontinues voire sont absentes (**fig. 14A-D** ; (Legouis et al. 2000; McMahon et al. 2001)). En outre, des observations en microscopie confocale à fluorescence ont montré que la déplétion de LET-413 entraîne une localisation discontinue de DLG-1 et AJM-1 dans les cellules intestinales (McMahon et al. 2001). Ainsi, LET-413 est requise pour compacter et positionner les protéines constitutives des CeAJ le long de la membrane apico-latérale. Ensuite, les CeAJ empêchent ensemble la diffusion latérale des protéines apicales. LET-413 est donc essentielle pour le maintien de la polarité apico-basale des entérocytes via son rôle sur les CeAJ.

Cependant, la fonction de LET-413 n'est pas limitée aux jonctions puisqu'il exerce également un rôle majeur sur le maintien du réseau terminal des entérocytes. En effet, la déplétion de LET-413 entraîne une distribution anormale de ACT-5, IFB-2 et IFO-1, constituants majeurs du réseau terminal dans l'intestin (**fig. 14E-H** ; (Bossinger et al. 2004; Carberry et al. 2012; Legouis et al. 2000)). Ces protéines, normalement enrichies au pôle apical, se localisent progressivement le long de la membrane basolatérale dans les cellules intestinales. C'est aussi le cas pour ERM-1, composant des microvillosités intestinales (Bossinger et al. 2004). Ces résultats suggèrent que le réseau terminal entier et les constituants de la bordure en brosse intestinale s'étendent vers la membrane basolatérale lorsque LET-413 est déplétée. Toutefois, ce phénotype n'est pas associé à la formation de microvillosités à la membrane basolatérale (Bossinger et al. 2004). L'absence de lumière intestinale visible ne permet pas de caractériser la potentielle présence de bordure en brosse au pôle apical.

Pour résumer, LET-413 empêche l'expansion basolatérale des protéines de polarité apicales, des composants de la bordure en brosse ainsi que du réseau terminal dans les entérocytes chez *C. elegans* (fig. 14). La délocalisation progressive des différents facteurs apicaux faisant suite à la déplétion de LET-413 suggère que LET-413 est nécessaire pour le maintien de la position apicale des structures spécialisées intestinales.



## 2. Comment se forme l'intestin du nématode ?

### a. Description des différentes étapes de la formation de l'intestin

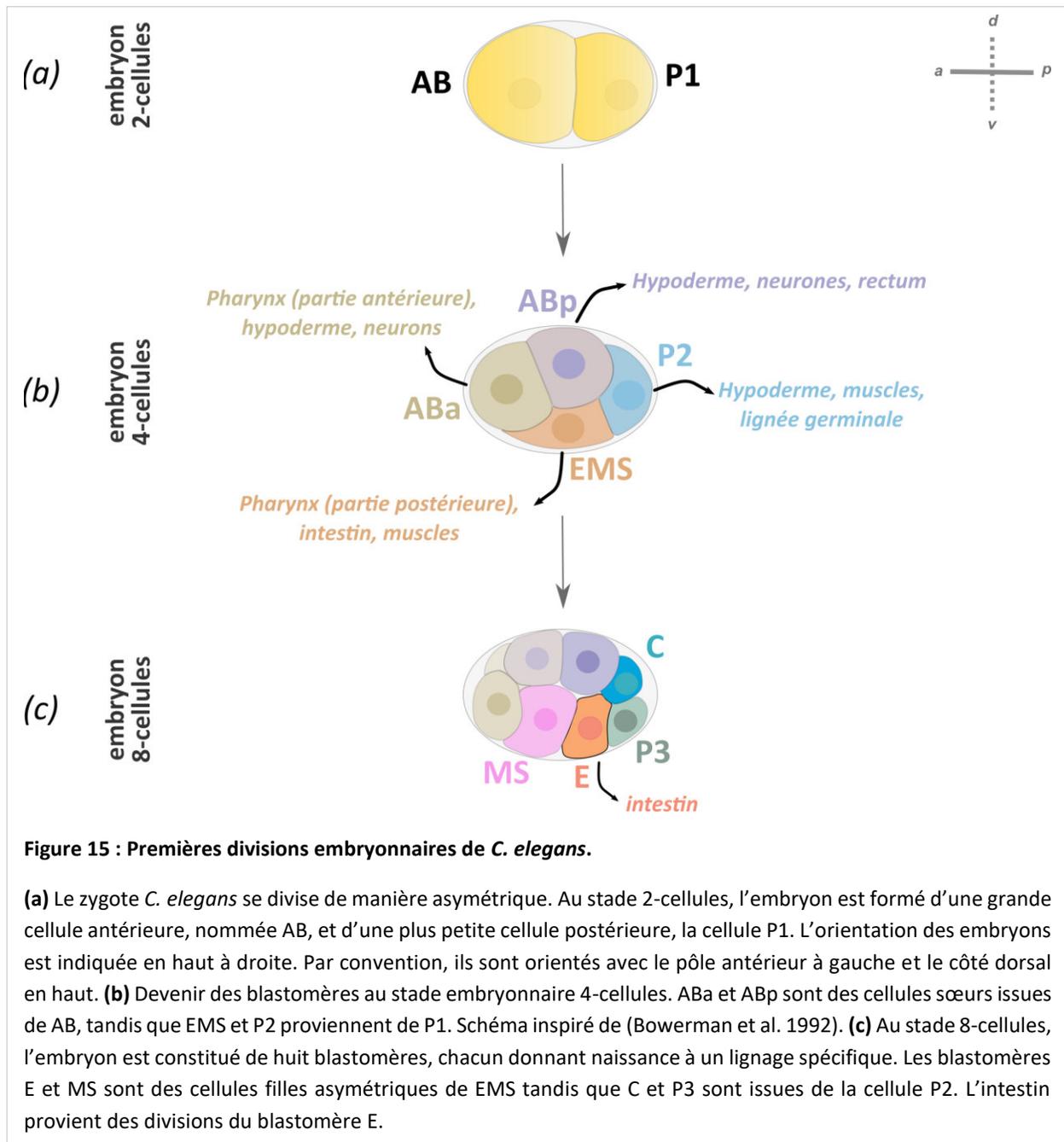
#### i. L'intestin entier provient d'une seule cellule : le blastomère E

Chez *C. elegans*, une seule cellule est à l'origine de l'intestin entier, composé de vingt entérocytes. Il s'agit du blastomère E constituant l'embryon 8-cellules et issu de la cellule EMS présente au stade 4-cellules. Ainsi, la spécification des cellules intestinales commence au sein de l'embryon 4-cellules. A ce stade, l'embryon possède les blastomères ABa, ABp, P2 et EMS (**fig. 15B**). Chacun de ces blastomères conduit à des lignages cellulaires différents. Concernant le tractus digestif, la cellule ABa produira notamment la partie antérieure du pharynx tandis que la cellule ABp donnera naissance aux cellules du rectum. Enfin, la cellule EMS de l'embryon 4-cellules se divise asymétriquement pour produire la cellule MS et la cellule E visibles au stade embryonnaire 8-cellules (**fig. 15B-C**). Le blastomère MS, cellule-fille antérieure de l'EMS, donnera naissance à la partie postérieure du pharynx ainsi qu'à d'autres tissus somatiques. Le blastomère E, cellule-fille postérieure de l'EMS, produira quant à lui l'entièreté de l'intestin de *C. elegans* (**fig. 15** ; pour revue : (Kormish et al. 2010)). La division asymétrique de la cellule EMS et la ségrégation différentielle de certains facteurs sont finement régulées afin de permettre la naissance de deux cellules filles aux destins cellulaires distincts. Ce processus de spécification au stade embryonnaire 4-cellules fait intervenir de multiples voies de signalisation et facteurs de transcription combinés que je détaillerai par la suite.

Au stade 8-cellules, la spécification cellulaire se poursuit au sein du blastomère E (**fig. 15C**). Une fois née, cette cellule se spécifie en adoptant une identité cellulaire intestinale qui repose essentiellement sur les facteurs de transcription spécifiques nommés *end-1* et *end-3*. Par la suite, le blastomère E se divise et produit ainsi l'intestin entier. Dans la littérature des études effectuées chez *C. elegans*, la spécification n'est pas dissociée de la détermination. J'utiliserai donc ce terme par la suite, notamment par rapport à l'expression des premiers gènes intestinaux *end-1* et *end-3*.

Enfin, la différenciation intestinale prend le relais de la spécification cellulaire plus tard au cours du développement de l'épithélium intestinal. Après leur spécification, les cellules descendantes de E se différencient pour devenir des entérocytes spécialisés dans l'absorption des nutriments issus de la lumière intestinale. Le programme de différenciation repose essentiellement sur le gène *e/t-2* encodant un facteur de transcription qui active l'expression de nombreux gènes spécifiques des entérocytes depuis l'embryon

jusqu'à la vie adulte du nématode. La différenciation intestinale permet ainsi aux entérocytes de développer leur fonction d'absorption des nutriments.



La régulation de ces processus de spécification et différenciation intestinale est cruciale. En effet, elle empêche la survenue d'une hyperplasie intestinale induite par le fait que d'autres cellules, non descendantes de E, adoptent un destin cellulaire intestinal. A l'inverse, une spécification défectueuse peut résulter en l'absence d'intestin qui entraîne la mort du nématode au premier stade larvaire successif à

l'éclosion. Par ailleurs, il ne suffit pas que les cellules soient normalement spécifiées, mais il faut également qu'elles se différencient correctement afin d'assurer leur fonction essentielle à la survie de l'organisme entier.

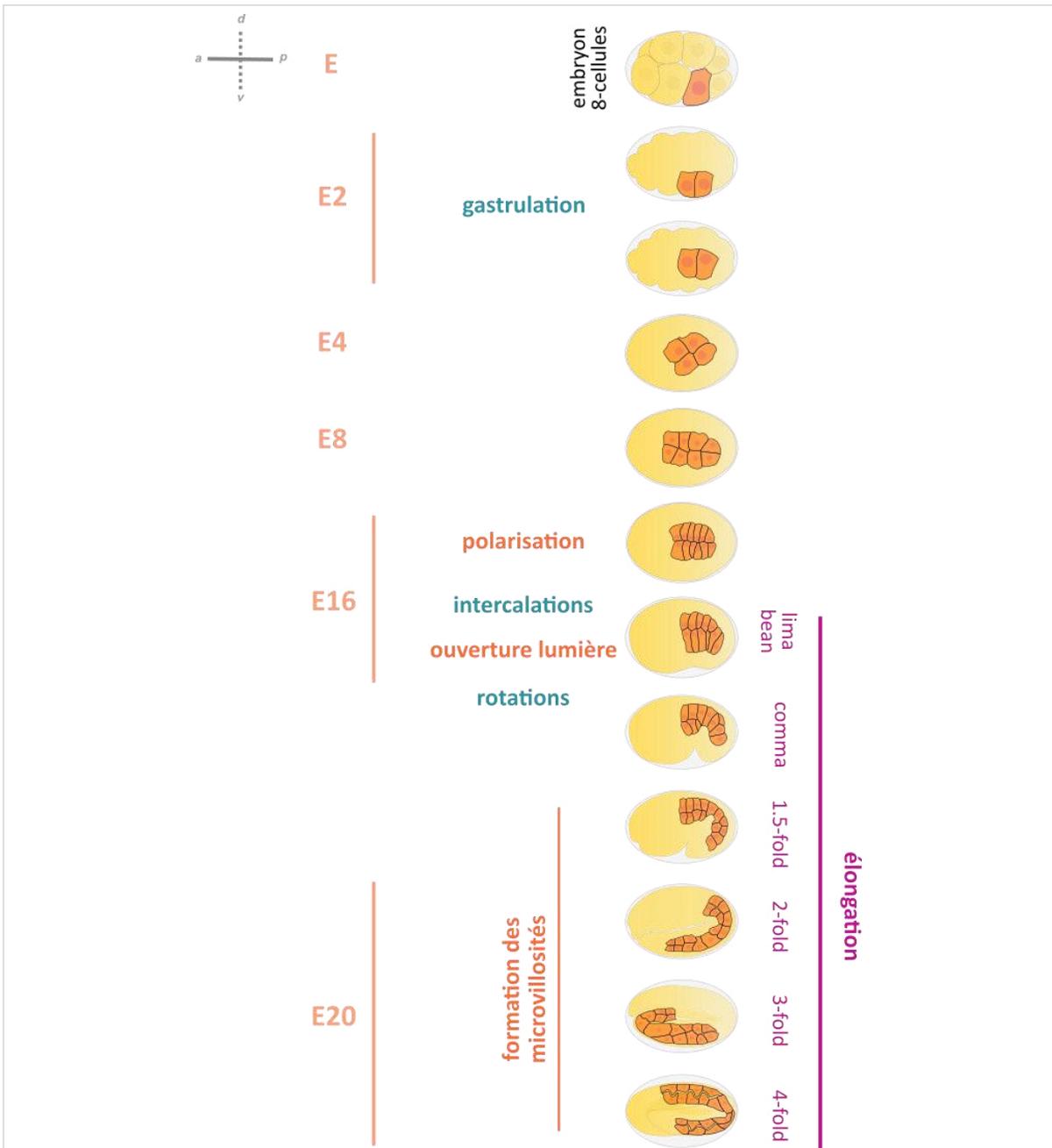
## ii. Les divisions successives du blastomère E

Le lignage cellulaire complet a été caractérisé chez le nématode. Il est stéréotypé, c'est-à-dire essentiellement invariant entre différents embryons. Au sein de ce lignage, les divisions successives stéréotypées du blastomère E pour produire *in fine* les vingt entérocytes ont notamment été décrites (**fig. 16** ; (Sulston et al. 1983)). Ces divisions cellulaires génèrent différents stades qui apparaissent successivement au cours du développement intestinal. Chaque stade est nommé en référence au nombre de cellules descendantes de E qu'il présente (**fig. 16** ; (Leung et al. 1999)). Par exemple, le stade « E4 » est constitué de quatre descendants de E. Par ailleurs, les cellules constituant l'intestin en devenir sont identifiées en référence aux axes de division subis successivement par leurs cellules mères. Il s'agit des axes antérieur-postérieur (a/p), gauche-droite (l/r) ou encore dorso-ventral (d/v). Par exemple, les quatre cellules filles du blastomère E sont nommées Eal, Ear, Epl et Epr, où « Eal » correspond à la cellule fille localisée à gauche issue de la cellule fille antérieure de E (pour revue : (Maduro 2017)). Il existe six stades : « E », « E2 », « E4 », « E8 », « E16 » et enfin, « E20 » (**fig. 16**). Le développement intestinal stéréotypé du nématode est ainsi rythmé par cinq divisions. Les quatre premières divisions concernent l'ensemble des cellules descendantes de E tandis que la dernière division ne concerne que certaines cellules spécifiques pour former *in fine* l'épithélium intestinal complet. Ces divisions intestinales successives peuvent être visualisées à l'aide d'un arbre de lignage (**fig. 17**). Les cellules au stade E2 se divisent selon l'axe gauche-droite tandis que les autres cellules intestinales se divisent globalement selon l'axe antéro-postérieur (**fig. 17** ; (Maduro 2017)). Suite à la division des cellules E2 puis E4, l'intestin au stade E8 est planaire, avec quatre cellules à droite et quatre cellules à gauche. Entre le stade E8 et E20, les divisions sont accompagnées d'une succession de mouvements cellulaires définissant ainsi la structure finale de l'intestin (**fig. 17** et voir partie **iii.** ci-dessous).

L'internalisation des précurseurs de l'intestin pour former l'endoderme se déroule au stade embryonnaire 26-28-cellules (**fig. 18**). L'intestin en devenir est alors au stade E2, constitué des deux cellules filles de E, nommées Ea et Ep. Ces dernières migrent depuis la partie ventrale de l'embryon vers l'intérieur de celui-ci (**fig. 18** ; (Leung et al. 1999)). Cette migration marque le début de la gastrulation chez *C. elegans* (pour revue : (Goldstein and Nance 2020)). La migration et l'internalisation de Ea et Ep

dépendent de la voie Wnt qui active l'actomyosine afin d'induire une constriction apicale des cellules (J. Y. Lee et al. 2006). Par ailleurs, la spécification correcte des cellules intestinales semble également importante pour ce processus (J. Y. Lee et al. 2006). Après avoir atteint le centre de l'embryon, les cellules E2 se divisent jusqu'à produire le stade E16, obtenu avant le début de l'élongation embryonnaire (**fig. 16,17**). Les divisions permettant ensuite d'obtenir le stade E20 ont elles lieu lors des premières étapes de l'élongation embryonnaire (**fig. 16**).

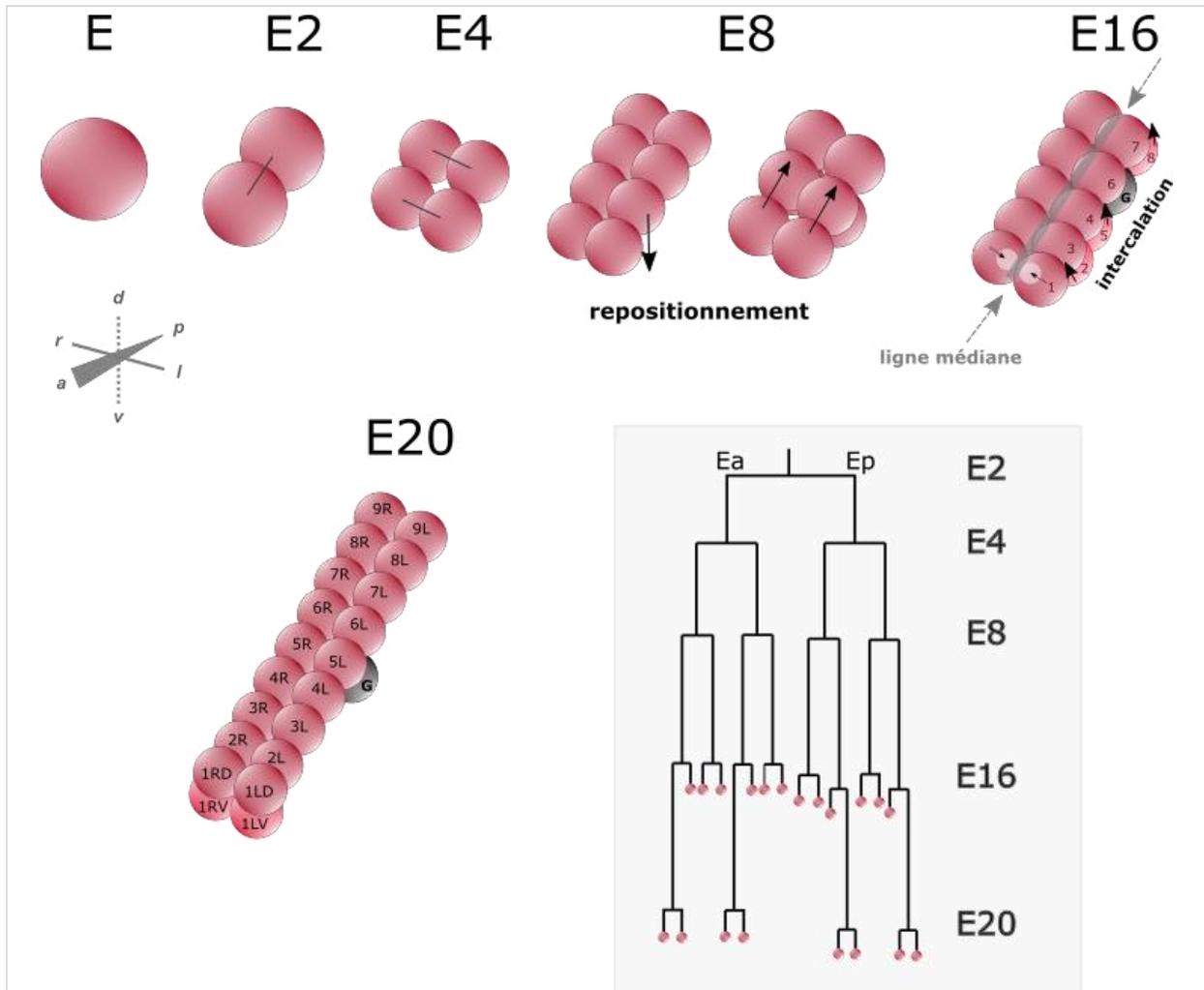
Au cours de son développement, l'embryon s'allonge progressivement au sein de sa coquille (**fig. 16**). L'élongation embryonnaire débute par le stade nommé « lima bean », en référence à la morphologie adoptée par l'embryon *C. elegans*. L'embryon s'allonge depuis une forme de haricot jusqu'à la forme caractéristique du nématode : sa longueur a été multipliée par 4 tandis que son diamètre a été réduit par 2 (pour revue : (Vuong-Brender et al. 2016)). Ce processus de morphogénèse essentiel reflète non pas les divisions des cellules de l'épiderme, mais leur élongation selon l'axe antéro-postérieur du nématode. Le début de l'élongation embryonnaire du nématode repose essentiellement sur la contractibilité de l'actomyosine dans les cellules de l'épiderme qui induit leur changement de forme cellulaire. Les contractions des cellules musculaires interviennent par la suite du processus. La nomenclature classe et nomme les embryons tardifs *C. elegans* en fonction de leur degré d'élongation. Ainsi, après le stade « lima bean », les embryons poursuivent leur élongation et atteignent successivement les stades « 1.2-fold », « 1.5-fold », « 2-fold », « 3-fold » et « 4-fold, avant d'éclore en larve (**fig. 16**). Le nombre de « fold » indique le nombre de repliements de l'embryon au sein de sa coquille. Le stade « 1.2-fold » est généralement référencé en tant que stade « comma ». Quand les muscles deviennent fonctionnels au stade 2-fold, l'embryon commence à se mouvoir au sein de sa coquille. L'élongation embryonnaire s'accompagne de l'élongation du tissu intestinal. Des mutations perturbant l'élongation de l'embryon bloquent également l'élongation intestinale, suggérant que des mécanismes similaires contrôlent l'élongation de l'épiderme ou de l'intestin ou que l'élongation intestinale nécessite l'élongation de l'embryon (Leung et al. 1999). En revanche, la morphogénèse de l'embryon peut correctement se dérouler en l'absence de l'intestin, (Owraghi et al. 2010).



**Figure 16 : Les différentes étapes du développement de l'intestin.**

Le blastomère E, présent dans l'embryon au stade 8-cellules, est à l'origine de l'intestin entier chez le nématode. Ses divisions successives génèrent les stades E2, E4, E8, E16 et E20 (orange), en référence au nombre de cellules constituant l'intestin en devenir. L'un des premiers événements de la gastrulation consiste en l'internalisation des cellules Ea et Ep pendant le stade E2. Au cours du stade E16, les cellules se polarisent et commencent à s'intercaler entre elle. En parallèle du développement intestinal, l'embryon s'allonge. Son élongation commence au stade lima bean, puis se poursuit au cours des stades comma, 1.5-fold, 2-fold, 3-fold et enfin, 4-fold (magenta). La lumière intestinale commence à s'ouvrir au stade lima bean. Les anneaux intestinaux subissent des rotations à partir de ce même stade. Les divisions cellulaires pour obtenir le stade E20 se déroulent entre le stade lima bean et 2-fold. Par ailleurs, les microvillosités se forment progressivement à partir du stade 1.5-fold pour devenir mature à la fin du développement embryonnaire.

iii. Les évènements cellulaires permettant l'obtention d'un intestin mature

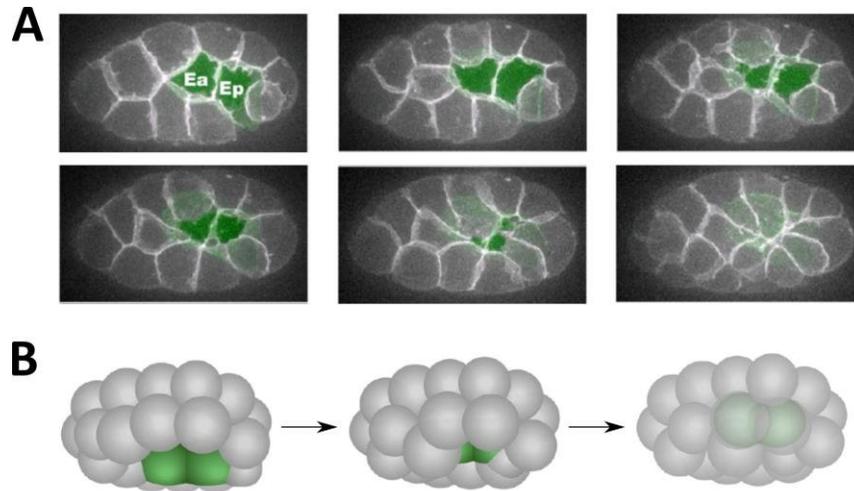


**Figure 17 : Le blastomère E et ses descendants formant l'intestin du nématode.**

Pour gagner en clarté, les cellules sont dessinées rondes sur le schéma. De la cellule E jusqu'au stade E16, la majorité des divisions des cellules descendantes de E sont globalement synchrones et se déroulent le long de l'axe antéro-postérieur. Seules les cellules Ea et Ep, constituant l'intestin au stade E2, se divisent selon l'axe gauche-droite. Au stade E8, deux cellules se repositionnent ventralement et l'espace est fermé par le mouvement des cellules les plus antérieures. Au stade E16, les cellules situées ventralement s'intercalent entre les cellules intestinales situées dorsalement. De plus, les noyaux (montrés pour la paire la plus antérieure) migrent vers le futur pôle apical. Lors de la polarisation, la ligne médiane se forme le long de l'axe antéro-postérieur et correspond aux membranes apicales des entérocytes de l'intestin en devenir. Les cellules précurseurs de la lignée germinale (G) sont associées aux cellules de l'int5. Au stade E20, les divisions des cellules les plus antérieures et les plus postérieures résultent en la formation de l'int1 composé de quatre cellules ainsi que des anneaux postérieurs int8 et int9. Les divisions successives de E et de ses descendants peuvent être représentées sous la forme d'un arbre de lignage visible dans l'encadré. Les traits verticaux indiquent le temps des stades, tandis que les traits horizontaux marquent les divisions intestinales. Les ronds roses représentent les 20 entérocytes finaux. Schémas inspirés de Leung *et al.*, 1999 et Maduro *et al.*, 2017.

L'élongation embryonnaire commence alors que l'intestin est au stade E16. Au début de ce stade, les entérocytes se polarisent afin de différencier leurs deux pôles cellulaires (**fig. 16**). Le déterminant de polarité PAR-3 est essentiel pour établir le domaine apical des entérocytes (Achilleos, Wehman, and Nance 2010; Feldman and Priess 2012). Au cours de la polarisation intestinale, de nombreuses protéines viendront s'enrichir au pôle apical, telles que des protéines de polarité (PAR-3, PAR-6, PKC-3), des protéines de jonctions (HMR-1, DLG-1), des futurs constituants des microvillosités (ERM-1, ACT-5), ou encore du réseau terminal (IFB-2) (Achilleos et al. 2010; Bidaud-Meynard et al. 2021; Feldman and Priess 2012). Au stade E16, l'intestin présente une symétrie gauche-droite (Leung et al. 1999). Lors de la polarisation, les cellules intestinales changent de forme, leurs noyaux se déplacent vers le pôle apical (**fig. 17**). Les futures membranes apicales des cellules intestinales forment alors la « ligne médiane » centrale (**fig. 17**). De par leur organisation caractéristique des entérocytes dans le tissu intestinal, le stade E16 sert de référence pour la nomenclature utilisée par Asan *et al.*, 2016. En effet, grâce à sa symétrie gauche-droite, il est aisé d'annoter les cellules en fonction de leur position.

Au début de l'élongation embryonnaire, au stade lima bean, de nombreux réarrangements cellulaires vont se dérouler. L'intestin en devenir contient alors deux couches distinctes de cellules avec 6 cellules situées ventralement par rapport aux 10 autres (**fig. 17** ; (Leung et al. 1999)). Afin de former un épithélium intestinal mature formé d'une seule couche de cellules, certains entérocytes s'intercalent entre d'autres (**fig. 17** ; (Asan et al. 2016)). En outre, certains anneaux intestinaux commencent à subir une rotation. Le stade lima bean marque également l'ouverture de la lumière intestinale au niveau de la ligne médiane, séparant ainsi les membranes apicales des entérocytes (Asan et al. 2016; Bidaud-Meynard et al. 2021; Leung et al. 1999). Par ailleurs, le passage du stade E16 au stade E20 commence au stade lima bean (**fig. 16**). Au cours de ce processus, seulement quatre descendants de E, les deux plus antérieurs et les deux plus postérieurs, subissent à nouveau une mitose afin de former l'intestin composé de vingt entérocytes (**fig. 17**). Le stade E20 est obtenu au stade 2-fold. En parallèle, au stade 1.5-fold, quelques protrusions apicales deviennent visibles. Progressivement, ces protrusions s'élargissent et s'allongent pour devenir des microvillosités formant une bordure en brosse intestinale régulière au stade 3-fold (**fig. 16** ; (Bidaud-Meynard et al. 2021)).



**Figure 18 : Internalisation de l'endoderme au stade E2 chez *C. elegans*.**

**(A)** Images issues d'un film montrant un embryon, en vue ventrale, exprimant un marqueur membranaire des cellules embryonnaires. Les deux descendants de E, Ea et Ep, sont colorés en vert. **(B)** Illustrations en trois dimensions de trois stades développementaux en vue ventrolatérale. Les cellules intestinales sont colorées en vert. Images adaptées de Goldstein and Nance, 2020.

Les paragraphes précédents décrivent les différentes étapes du développement de l'intestin depuis l'origine du blastomère E jusqu'à la formation de la bordure en brosse intestinale (**fig. 14-17**). Dans les parties suivantes, je détaillerai les mécanismes impliqués dans la régulation de ces étapes afin de former un épithélium intestinal stéréotypé. Ainsi, j'aborderai le réseau génétique complexe permettant de spécifier les cellules intestinales, mais aussi la régulation des divisions successives de E et de ses descendants. Enfin, je terminerai en abordant les processus cellulaires qui produisent un intestin mature : la polarisation apico-basale, la formation de la bordure en brosse intestinale ainsi que les réarrangements cellulaires à l'échelle du tissu.

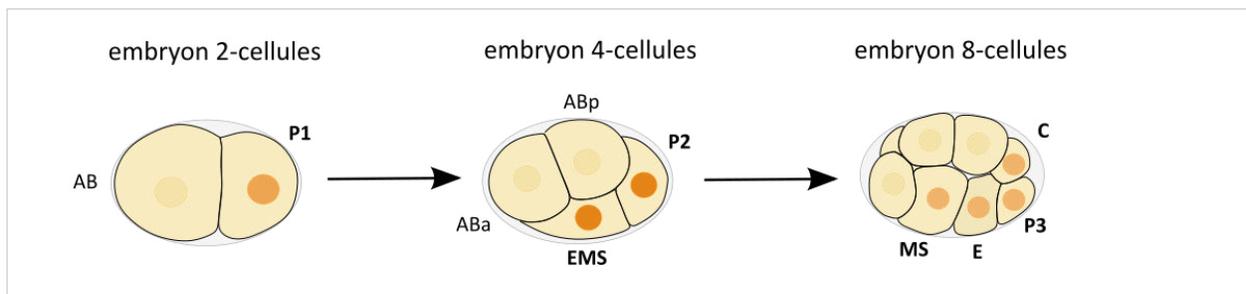
## **b. Un réseau génétique complexe pour spécifier les cellules intestinales**

### **i. SKN-1, un acteur essentiel à la spécification des entérocytes**

Le facteur de transcription SKN-1 joue un rôle majeur pour définir le devenir des cellules filles du blastomère EMS : MS et E. En effet, après induction de la perte de fonction de SKN-1 via des mutations thermosensibles, la grande majorité des embryons ne possède aucune des cellules normalement issues du lignage MS. En parallèle, 45-90% de ces mêmes embryons présentent également une absence de cellules intestinales, normalement produites par le lignage E (Bowerman, Eaton, and Priess 1992). Par

ailleurs, dans ces embryons mutants *skn-1*, les cellules issues du blastomère EMS se mettent à exprimer des marqueurs normalement caractéristiques des descendants du lignage C. C'est le cas notamment de marqueurs de l'hypoderme, d'où l'appellation « SKN-1 » pour « skinhead » (Bowerman et al. 1992; McGhee 2013). SKN-1 joue donc un rôle majeur pour l'acquisition du potentiel de mésoendoderme du blastomère EMS. Toutefois, alors que SKN-1 est primordial pour le lignage MS, 10-55% des embryons *skn-1* possèdent des cellules intestinales (Bowerman et al. 1992). Cette observation indique que des voies de signalisation parallèles à SKN-1 contribuent à la spécification de l'intestin. J'aborderai ces points dans les parties **iv.**, **v.** et **vi.**

Ce rôle de SKN-1 dans le processus de spécification du blastomère EMS a été montré comme étant strictement lié à une contribution maternelle, c'est-à-dire apportée par la lignée germinale maternelle, et non pas zygotique (Bowerman et al. 1993). Contrairement aux transcrits ARNm *skn-1* qui sont uniformément répartis au sein de l'ovocyte, la protéine SKN-1 est quant à elle localisée asymétriquement (**fig. 19**). Cette distribution protéique a été caractérisée grâce à des expériences d'immunofluorescence (Bowerman et al. 1993). Dans l'embryon précoce, SKN-1 est présente essentiellement dans les cellules embryonnaires postérieures. Au stade 2-cellules, elle est enrichie dans la cellule postérieure P1. Cette ségrégation est maintenue au stade 4-cellules dans les cellules EMS et P2, obtenues suite à la division de P1. Cet enrichissement perdure encore au stade 8-cellules dans les cellules filles des blastomères EMS et P2, c'est-à-dire, les cellules MS, E, C et P3. Les niveaux protéiques de SKN-1 sont les plus élevés au stade 4-cellules, puis ils déclinent ensuite rapidement jusqu'à ce que la protéine SKN-1 ne soit plus détectée au stade 12-cellules (**fig. 19** ; (Bowerman et al. 1993)). Toutefois, même si des observations de la protéine SKN-1 fusionnée à un fluorochrome ont complété cette analyse d'immunofluorescence (SKN-1-GFP, An



**Figure 19 : Niveaux protéiques de SKN 1 lors des premières divisions embryonnaires chez *C. elegans*.**

La distribution de la protéine SKN-1 est indiquée par les nuances de la couleur orange. Dans l'embryon 2-cellules, la protéine SKN-1 est enrichie dans la cellule P1. Les niveaux protéiques de SKN-1 les plus élevés sont atteints au stade 4-cellules, spécifiquement dans les blastomères EMS et P2. Puis, les niveaux protéiques de SKN-1 diminuent tout en demeurant visibles au stade 8-cellules dans les cellules MS, E, P3 et C. Au stade 12-cellules, SKN-1 n'est plus détectable. Analyse des niveaux protéiques basées sur des expériences d'immunofluorescence de SKN-1. Schéma inspiré de Bowerman *et al.*, 1993.

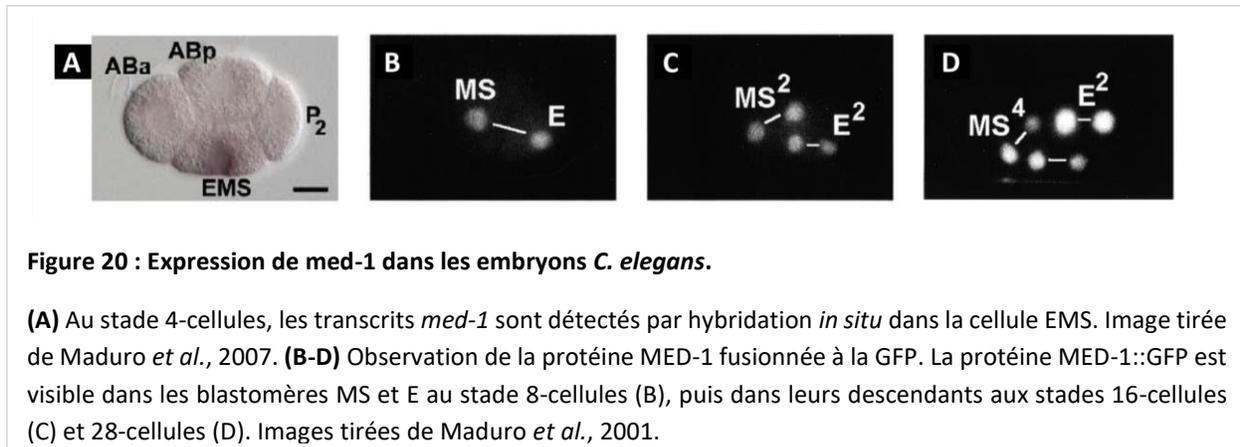
and Blackwell, 2003), la caractérisation de la dynamique de la protéine SKN-1 au cours des premiers stades embryonnaires n'a toujours pas été décrite dans la littérature à ce jour.

Par ailleurs, en plus de sa fonction embryonnaire dans la spécification, SKN-1 exerce également un rôle à l'âge larvaire et adulte dans la régulation de la réponse au stress au sein de l'intestin (An et al. 2005; An and Blackwell 2003). Alors que la protéine SKN-1 est nucléaire dans les stades embryonnaires, elle est maintenue dans le cytoplasme des entérocytes de manière constitutive dans les stades post-embryonnaires grâce à sa phosphorylation par GSK-3, l'homologue de GSK3 $\beta$ . Toutefois, en réponse au stress oxydatif, l'inhibition par GSK-3 est levée et SKN-1 s'accumule alors dans les noyaux des cellules intestinales (An et al. 2005; An and Blackwell 2003). Les mutants *skn-1* sont sensibles au stress oxydatif avec une longévité diminuée par rapport aux contrôles. Ainsi, SKN-1 protège du stress oxydatif dans les stades larvaire et adulte du nématode.

## ii. Les protéines MED-1,2 participent à la spécification de l'endoderme

Les deux gènes cibles immédiats de SKN-1 sont les gènes *med-1* et *med-2*. Il s'agit de facteurs de transcription essentiels pour spécifier le mésendoderme chez *C. elegans*, d'où leur appellation « MED » pour « mesendoderm ». Les séquences des gènes sont presque identiques sur une région d'environ 1,3 kpb, ce qui suggère qu'ils sont issus d'une duplication récente (Maduro et al. 2001). De plus, leurs structures sont identiques à 98% et leurs régions régulatrices en amont et en aval ont 90% d'identité. Cette forte similarité suggère que les protéines MED-1 et MED-2 fonctionnent de façon redondante, ce qui a été vérifié par de nombreuses études par la suite. Ainsi, dans la littérature, elles sont nommées ensemble les protéines MED-1,2.

L'expression des gènes *med-1,2* débute au sein du blastomère EMS (**fig. 20A** ; (Maduro et al. 2007)). Les protéines MED-1,2 fusionnées à un fluorochrome sont ensuite détectées dans les cellules E et MS, ainsi que dans leurs descendants respectifs (**fig. 20B-D** ; (Maduro et al. 2001)). Toutefois, la distribution et la dynamique des protéines MED-1,2 endogènes au cours de l'embryogenèse précoce n'ont pas été caractérisées à ce jour. L'expression des gènes *med-1,2* est directement activée par le facteur de transcription SKN-1 (Maduro et al. 2001).

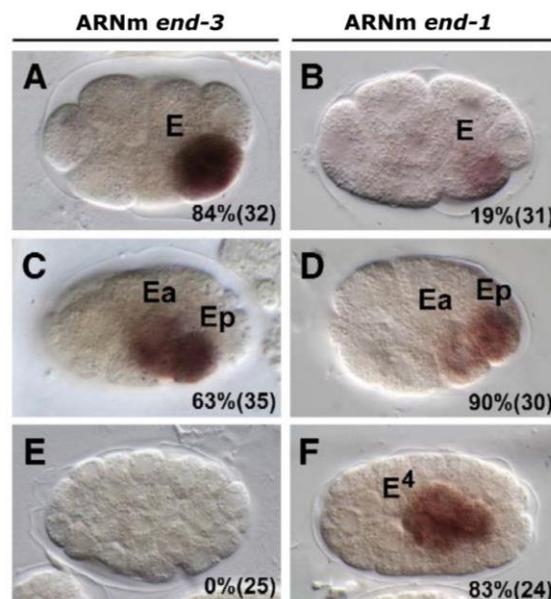


La double déplétion des MED-1,2 induit un phénotype similaire à l'absence de SKN-1 dans les embryons *C. elegans*. En effet, aucun embryon mutant *med-1,2* ne présente de tissus provenant du lignage MS (Maduro et al. 2001). Des expériences d'isolation de blastomères ont révélé que le blastomère MS adopte le destin du blastomère C dans tous les embryons *med-1,2* (Maduro et al. 2001, 2007). Cela suggère que les protéines MED-1,2 sont essentielles à la spécification de MS en mésendoderme. Par ailleurs, environ 50% des embryons *med-1,2* ne présentent pas d'intestin (Bowerman et al. 1992; Maduro et al. 2001) : la cellule E adopte alors le destin du blastomère C. De plus, les embryons *med-1,2* qui produisent de l'intestin présentent en moyenne moins d'entérocytes ou une variabilité accrue du nombre de cellules intestinales spécifiées (Maduro et al. 2007). Au total, environ 95% des embryons *med-1,2* présentent des défauts de formation de l'intestin : soit ils n'ont pas d'intestin, soit ils ont un nombre anormal d'entérocytes. Réciproquement, l'expression ubiquitaire de MED-1 dans l'ensemble de l'embryon suffit à convertir des blastomères non-EMS en précurseurs du mésendoderme (Maduro et al. 2001). Ainsi, les protéines MED-1,2 sont des régulateurs importants du développement de l'intestin chez *C. elegans*.

### iii. END-1,3 : les premiers facteurs de transcription spécifiques de l'intestin

Dans le blastomère E, les protéines MED-1,2 peuvent se lier aux promoteurs des gènes nommés *end-1* et *end-3* afin d'activer leur expression. Cette liaison directe a été montrée *in vitro* et *in vivo* (Maduro *et al.*, 2002 ; Broitman-Maduro *et al.*, 2005). Cette relation est aussi illustrée par le fait que la double déplétion de MED-1,2 entraîne une faible expression des gènes *end-1* et *end-3* (Maduro *et al.*, 2001).

Les gènes *end-1* et *end-3* encodent les premiers facteurs de transcription à être exprimés spécifiquement dans le lignage E de manière zygotique : ce sont des marqueurs de la spécification intestinale (Maduro, Hill, et al. 2005; Zhu et al. 1997, 1998). Les transcrits des gènes *end-1* et *end-3* sont détectés dans le blastomère E jusqu'aux stades E4 et E2, respectivement (**fig. 21** ; (Maduro et al. 2007; Zhu et al. 1997)). *end-3* est non seulement activé avant *end-1* dans le blastomère E, mais il contribue également à activer l'expression de *end-1* (Maduro et al. 2007). En effet, les embryons déplétés en END-3 présentent des niveaux d'ARNm *end-1* plus faibles que chez les embryons contrôles. Toutefois, les niveaux protéiques endogènes de END-1 et END-3 n'ont pas encore été caractérisés ; ainsi, il n'est pas décrit précisément quand ces facteurs apparaissent et disparaissent dans les descendants de E.



**Figure 21 : Expression de *end-3* et *end-1* dans l'endoderme des embryons *C. elegans*.**

(A-F) Détection des transcrits par hybridation *in situ* montrée pour *end-3* aux stades 1E (A), 2E (C) et 4E (E) et pour *end-1* aux stades similaires dans les panels B, D et F respectivement. *end-3* est exprimé avant *end-1* dans le blastomère E ; leur expression persiste respectivement jusqu'aux stades E2 et E4. Les pourcentages indiquent la proportion d'embryons à un stade donné qui présentent un signal, avec le nombre total d'embryons observés entre parenthèses. Notons que dans les panels C et D, le signal est plus fort dans Ep que Ea. Les auteurs ont observé cette asymétrie dans environ 50% des embryons ; un signal symétrique a été noté dans les autres embryons. Images tirées de Maduro *et al.*, 2007.

Ces gènes sont localisés à des loci séparés de seulement 28 kpb, suggérant qu'ils proviennent tous deux d'un évènement de duplication (Maduro, Hill, et al. 2005). De plus, la déplétion seule de END-1 ou de END-3 n'inhibe pas, ou peu, la spécification de l'endoderme (Maduro, Hill, et al. 2005; Owrighi et al. 2010). En revanche, la double déplétion de END-1 et END-3 bloque totalement la production de l'endoderme (Maduro, Hill, et al. 2005; Owrighi et al. 2010). Ces résultats suggèrent une forte redondance fonctionnelle entre ces deux facteurs. C'est pourquoi, de la même manière que pour les protéines MED-1,2, les gènes *end-1* et *end-3* sont nommés conjointement « *end-1,3* ».

Les facteurs de transcription END-1 et END-3 sont essentiels pour la spécification de l'endoderme dans l'embryon *C. elegans*. C'est grâce à leur rôle qu'ils sont appelés « END » pour « endoderm ». L'absence de cellules intestinales dans les embryons déplétés en END-1,3 est expliquée par le fait que le blastomère E adopte le destin cellulaire non-endodermal du blastomère C (Owrighi et al. 2010). Mis en évidence par des expériences d'isolation de blastomères, ce phénotype de changement d'identité cellulaire est similaire à celui observé en l'absence de SKN-1 ou des MED-1,2. Par ailleurs, l'expression ectopique de *end-1* est suffisante pour induire la spécification de l'endoderme dans tout l'embryon, et pas uniquement depuis le lignage E (Zhu et al. 1998). Ainsi, une forte expression de *end-1* peut produire de l'endoderme, indépendamment de la contribution de SKN-1 et des MED-1,2 en amont.

Les facteurs END-1,3 exercent ainsi une fonction principale commune avec toutefois des rôles spécifiques pour chacun d'entre eux. Signal d'induction de l'endoderme, leur expression révèle la spécification des cellules intestinales.

#### **iv. Régulation de l'activité et/ou de la dégradation de SKN-1**

Le facteur SKN-1 étant un acteur majeur de la formation du mésendoderme, il est essentiel qu'il ne soit actif que dans les cellules à l'origine du mésendoderme, à savoir le blastomère EMS et ses descendants. Pour se faire, plusieurs mécanismes existent afin de réguler finement son activité et/ou sa dégradation dans les lignages issus de EMS, mais aussi dans ceux issus des autres blastomères. Je présenterai ici les principaux mécanismes de régulation de SKN-1.

##### **1) Dégradation de SKN-1 par EEL-1**

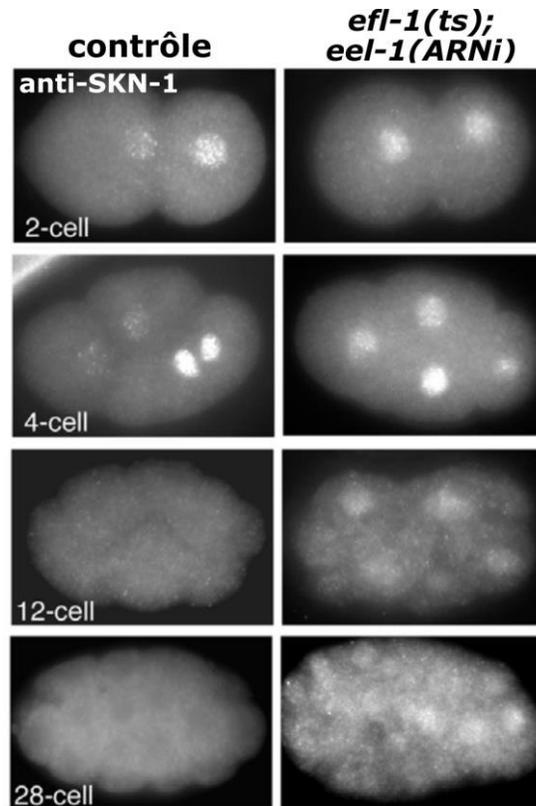
Comme décrit auparavant, les niveaux protéiques de SKN-1 sont asymétriques au cours du développement embryonnaire. Ils sont plus élevés dans les blastomères postérieurs par rapport aux

blastomères antérieurs. Une manière de maintenir cette asymétrie essentielle à la fonction de SKN-1, consiste à contrôler spatialement et temporellement sa dégradation.

Il a été montré que l'ubiquitine ligase EEL-1 (*enhancer of efl-1*) contrôle l'asymétrie de SKN-1. Cette dernière est spécifiquement dégradée par EEL-1, en interaction avec EFL-1, dans la cellule AB au stade 2-cellules. En effet, l'interaction directe de EEL-1 avec le domaine C-terminal de SKN-1 a été caractérisée (Page et al. 2007). Alors que les embryons mutants thermosensibles *efl-1(ts)* meurent à la température restrictive (25°C), la majorité d'entre eux survivent à la température semi-permissive (20°C) (Page et al. 2007). Les embryons mutants *eel-1(null)* sont quant à eux viables. En revanche, à 20°C, les embryons mutants *efl-1(ts)* déplétés en EEL-1 ne sont pas viables (Page et al. 2007), révélant la contribution de EEL-1 dans l'embryogenèse. Ces embryons *efl-1(ts)* déplétés en EEL-1 présentent des niveaux anormalement élevés de SKN-1 dans la cellule AB antérieure au stade 2-cellules, et dans ses descendants aux stades 4 et 8-cellules (Page et al. 2007). La présence anormale de SKN-1 dans les descendants du blastomère antérieure AB entraîne l'expression ectopique de gènes du mésoderme, tel que *med-1* (Maduro et al. 2001; Tenlen et al. 2006). Par conséquent, les embryons mutants *efl-1(ts)* déplétés en EEL-1 présentent un excès de cellules adoptant la même identité que les descendants de MS, comme des cellules musculaires et pharyngales. Ce phénotype est surnommé « mex » pour « muscle excess ».

Par ailleurs, la double perte de fonction de EEL-1 et EFL-1 perturbe non seulement l'asymétrie de SKN-1 aux stades 2- et 4-cellules, mais entraîne aussi la stabilisation de SKN-1 dans les descendants des blastomères antérieurs et postérieurs dans les stades embryonnaires plus tardifs, 12- et 28-cellules (**fig. 22** ; (Page et al. 2007)).

Pour résumer, EEL-1, conjointement avec EFL-1, régule la distribution spatiale de SKN-1, ainsi que sa stabilité au cours du développement embryonnaire du nématode.



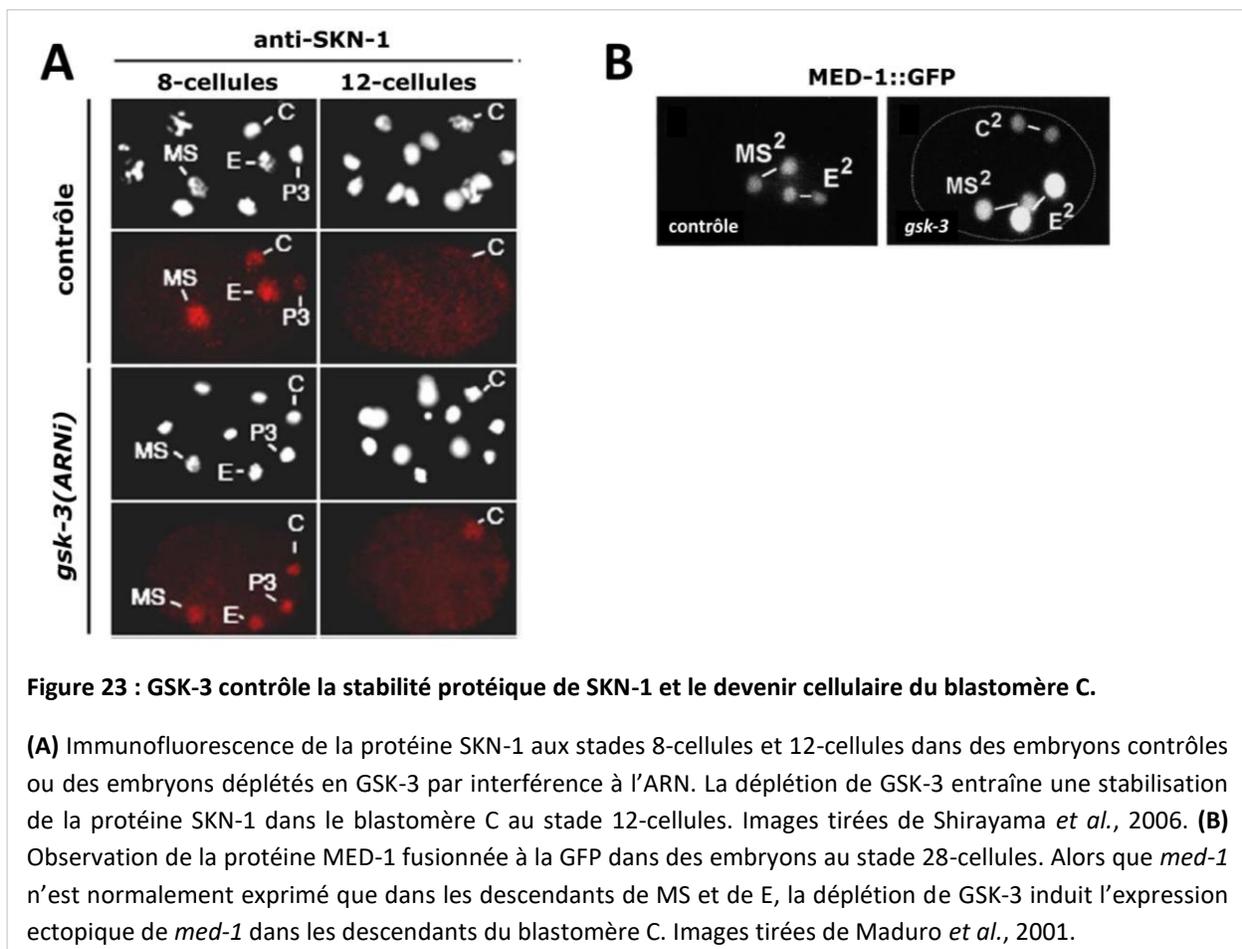
**Figure 22 : La double perte de fonction de l'ubiquitine ligase E3 EEL-1 et de la protéine EFL-1 perturbe la régulation spatiale et temporelle de SKN-1 dans l'embryon *C. elegans*.**

Immunofluorescence de la protéine SKN-1 à différents stades : 2-cellules, 4-cellules, 12-cellules et 28-cellules (de haut en bas). Dans les embryons contrôles, SKN-1 est asymétriquement distribuée aux stades 2- et 4-cellules avec un enrichissement dans les cellules postérieures P1 et ses cellules filles, EMS et P2. SKN-1 n'est ensuite plus détectée aux stades 12- et 28-cellules. A 20°C, dans les embryons mutants *efl-1(ts)* déplétés en EEL-1 par interférence à l'ARN, la distribution de SKN-1 devient symétrique dans les embryons précoces. De plus, la protéine SKN-1 persiste au stade 12-cellules et au-delà. Images tirées de Page *et al.*, 2007.

## 2) Dégradation de SKN-1 dans le blastomère C par GSK-3 et OMA-1

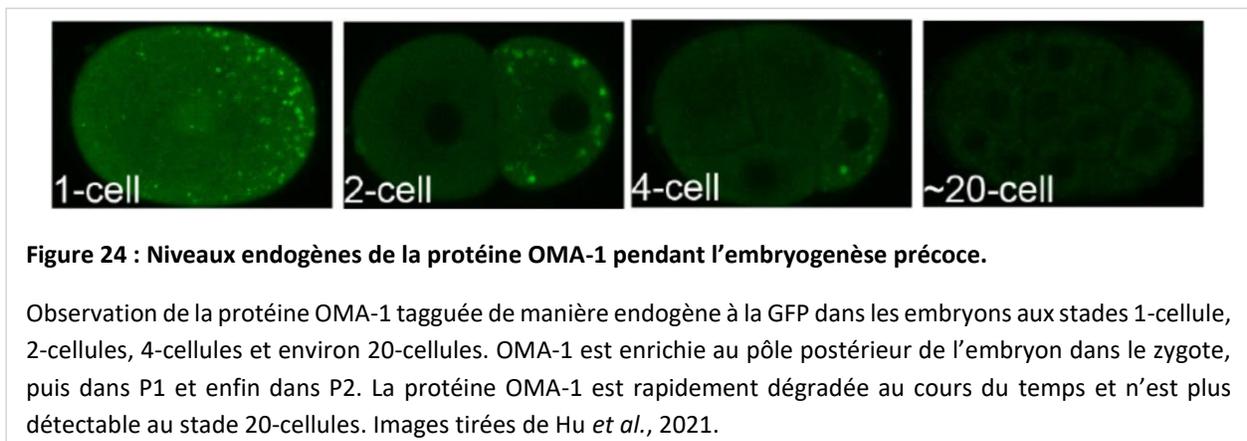
Outre EEL-1, plusieurs autres mécanismes permettent de contrôler la stabilité protéique de SKN-1, notamment dans le blastomère C. Au sein de l'embryon 8-cellules, le blastomère C contient des protéines SKN-1 mais n'exprime pas les gènes *med-1,2* et ne produit pas de mésendoderme. Ceci a été attribué au faible niveau protéique de SKN-1 dans le blastomère C au stade 8-cellules, puis à sa disparition au stade 12-cellules (Hunter and Kenyon 1996). Ainsi, la stabilité spatiale et temporelle de SKN-1 est finement régulée dans l'embryon. Deux protéines sont notamment impliquées dans ce processus : GSK-3 et OMA-1.

GSK-3 est une protéine kinase et l'homologue de GSK3 $\beta$  (Maduro et al. 2001). Chez *C. elegans*, la déplétion de GSK-3 entraîne la stabilisation de SKN-1 dans le blastomère C au stade 12-cellules (**fig. 23A** ; (Shirayama et al. 2006)). Cette dérégulation conduit à l'expression ectopique de *med-1* dans les descendants de C, en plus des descendants de EMS (**fig. 23B** ; (Maduro et al. 2001)). Par la suite, les embryons déplétés en GSK-3 présentent une expression ectopique de *end-1* dans le lignage C, plus particulièrement dans les descendants de la cellule postérieure de C, nommée Cp (Maduro et al. 2001). Toute cette voie de signalisation exprimée anormalement dans le blastomère C est dépendante de SKN-1 puisque MED-1 n'est pas détectée lorsque la déplétion de GSK-3 est effectuée dans les embryons mutants *skn-1(null)* (Maduro et al. 2001). Au final, l'absence de GSK-3 entraîne la présence d'un excès de cellules intestinales, causé par la spécification anormale des descendants de Cp qui adoptent un destin similaire aux descendants de E (Schlesinger et al. 1999; Shirayama et al. 2006). La localisation de la protéine GSK-3 dans l'embryon *C. elegans* n'a pas été décrite dans la littérature à ce jour.



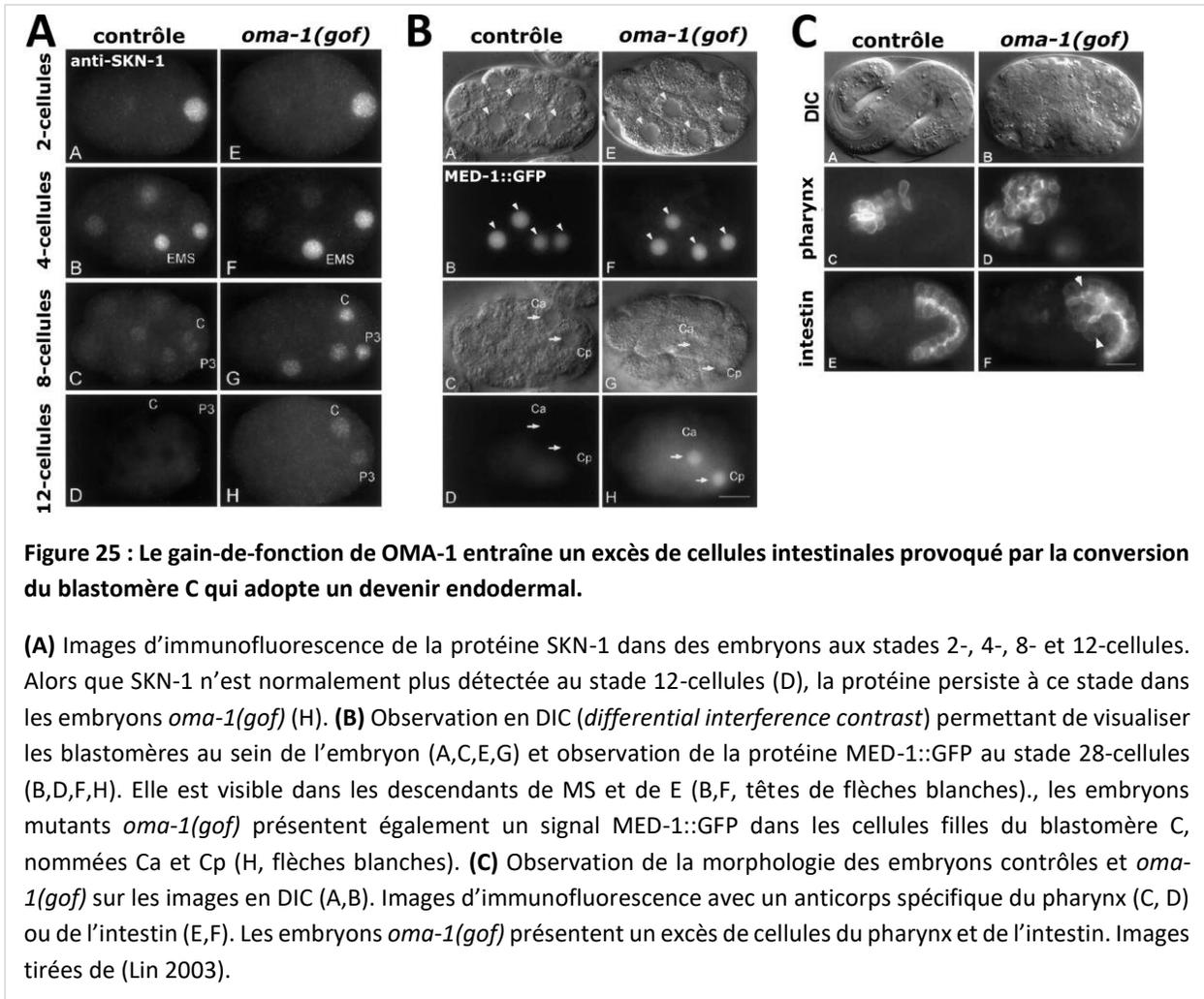
En plus de GSK-3, la protéine OMA-1 (*oocyte maturation defective-1*) est aussi impliquée dans la stabilité de SKN-1 au sein du blastomère C chez *C. elegans*. La protéine OMA-1 a été décrite comme ayant un rôle dans la maturation des ovocytes ainsi que dans la transition ovocyte-embryon. Elle est capable de réprimer la traduction de certains ARN messagers maternels.

OMA-1 est associée avec les « granules P » (Hu et al. 2021; Lin 2003). Ces derniers correspondent à des ribonucléoprotéines spécifiquement ségréguées dans le cytoplasme de la lignée germinale, donc dans le lignage P situé au pôle postérieur de l'embryon (pour revue : (Phillips and Updike 2022)). Les niveaux protéiques endogènes de la protéine OMA-1 évoluent au cours des divisions embryonnaires. Ils sont tout d'abord très élevés dans les ovocytes ainsi qu'au stade zygote après la fécondation (**fig. 24** ; (Hu et al. 2021)). Par la suite, OMA-1 est rapidement dégradée : la protéine endogène reste détectable au stade 2-cellules et 4-cellules, respectivement dans les cellules postérieures P1 et P2 (**fig. 24**). Au stade 20-cellules, OMA-1 n'est plus détectable (**fig. 24** ; (Hu et al. 2021)).



La régulation de la distribution temporelle de OMA-1 est essentielle pour le devenir cellulaire du blastomère C. Le gain de fonction de OMA-1, induit par une mutation au sein du site de phosphodébron de *oma-1*, empêche sa dégradation (Lin 2003). Stabilisée, OMA-1 est alors anormalement visible au stade 16-cellules, alors qu'elle n'est plus détectée à ce stade dans les embryons contrôles (Lin 2003). Cette stabilisation de OMA-1 a à son tour un effet sur la stabilité de SKN-1. En effet, les embryons *oma-1(gof)* présentent une stabilisation de SKN-1 dans les blastomères C et P3 au stade 12-cellules, alors que les embryons contrôles ne présentent pas de signal à ce stade (**fig. 25A** ; (Lin 2003)). Par ailleurs, la stabilité augmentée de SKN-1 dans le blastomère C induit l'expression ectopique de *med-1* dans les cellules filles antérieure et postérieure du blastomère C, nommées Ca et Cp, respectivement (**fig. 25B** ; (Lin 2003)). De plus, 90% embryons *oma-1(gof)* présentent un excès de cellules intestinales (**fig. 25C** ; (Du et al. 2015; Lin

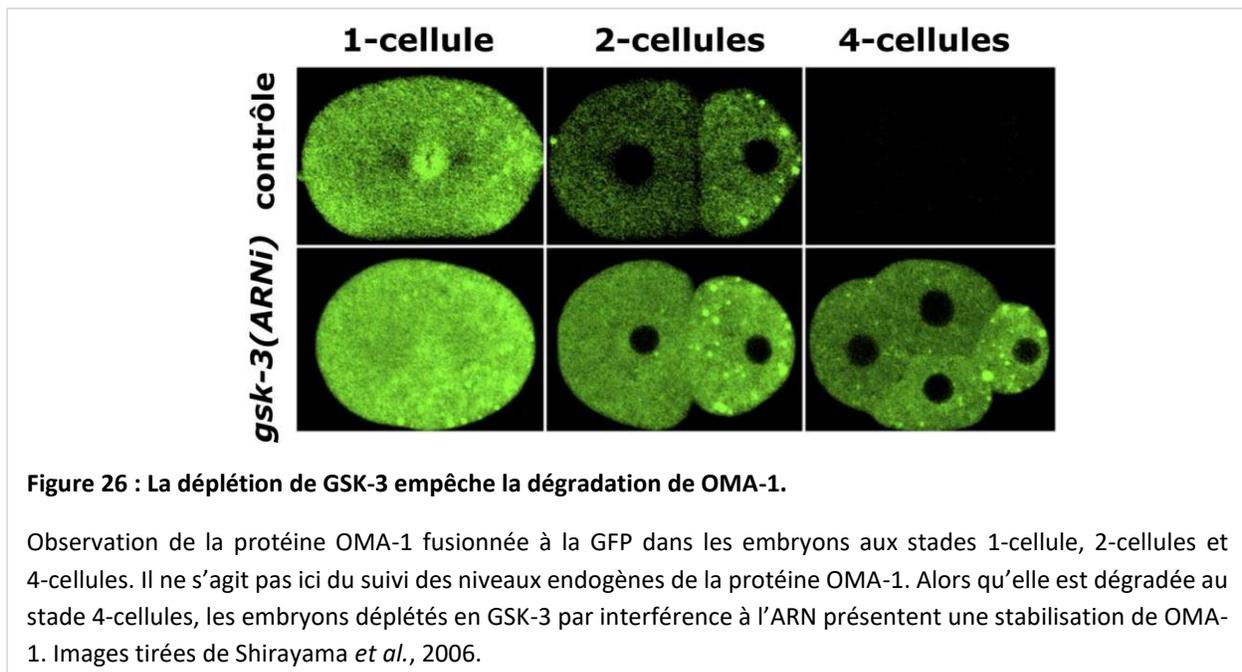
2003)). Ce phénotype est induit par une conversion du devenir cellulaire du blastomère C qui adopte l'identité du blastomère E, à l'origine de l'endoderme (Lin 2003).



Le phénotype des embryons *oma-1(gof)* est similaire à celui obtenu suite à la déplétion de GSK-3 : une stabilisation de SKN-1 dans le blastomère C conduisant à une expression ectopique de *med-1*, puis à la production d'un excès d'entérocytes. Dans les embryons déplétés en GSK-3, il s'agit des descendants de Cp qui produisent anormalement de l'endoderme (Maduro et al. 2001). Toutefois, cette caractérisation n'a pas été effectuée dans les embryons *oma-1(gof)* qui expriment cependant *med-1* dans les cellules Ca et Cp (Lin 2003).

Comment GSK-3 et OMA-1 régulent-ils SKN-1 dans les blastomères de l'embryon *C. elegans* ? Dans l'intestin du nématode adulte, la phosphorylation de SKN-1 par GSK-3 inhibe sa translocation dans le noyau

des entérocytes (An et al. 2005). Dans l'embryon, il n'a toutefois pas été démontré que GSK-3 agit directement sur SKN-1. En revanche, GSK-3 régule la dégradation de OMA-1 ; les embryons déplétés en GSK-3 présentent une stabilisation de OMA-1 (fig. 26, 30 ; (Nishi and Lin 2005; Shirayama et al. 2006)). De plus, la double perte de fonction de GSK-3 et OMA-1 réduit la proportion d'embryons dans lesquels le blastomère C produit de l'intestin, par rapport à la déplétion seule de GSK-3 (Shirayama et al. 2006). Ces résultats suggèrent ainsi que la stabilisation de SKN-1 observée en absence de GSK-3 pourrait être indirectement due à la stabilisation de OMA-1. Toutefois, l'interaction directe entre GSK-3 et OMA-1 n'a pas été caractérisée.



Les mécanismes moléculaires par lesquels la stabilisation de OMA-1 entraîne la stabilisation de SKN-1 ne sont pas caractérisés (Du et al. 2015; Lin 2003). Dans un papier de Du et ses collaborateurs publié en 2015, les auteurs émettent l'hypothèse que OMA-1 contrôle indirectement la dégradation de SKN-1, en réprimant la traduction d'ubiquitine ligases (Du et al. 2015).

### 3) Dégradation de SKN-1 dans le blastomère EMS : rôle d'ubiquitines ligases basées sur les cullines CUL-1 et CUL-2

Par ailleurs, les niveaux protéiques de SKN-1 doivent également être finement régulés au sein même du blastomère EMS. Dans les embryons contrôles, SKN-1 montre une expression transitoire dans le

blastomère EMS qui diminue rapidement après la division de EMS (Bowerman et al. 1993; Page et al. 2007). Il a été montré que plusieurs composants d'ubiquitines ligases basées sur les cullines CUL-1 et CUL-2, notamment SKR-1/2, sont requis pour la dégradation temporelle de SKN-1 au cours de la transition EMS-MS (Du et al. 2014, 2015). Dans les embryons déplétés en SKR-1/2, les niveaux protéiques de SKN-1 dans le blastomère EMS sont similaires aux embryons contrôles. En revanche, la réduction du niveau protéique au cours du temps est significativement diminuée et SKN-1 persiste alors pour un cycle cellulaire supplémentaire (Du et al. 2014, 2015). La dégradation retardée de SKN-1 entraîne une réitération de EMS. En effet, dans les embryons déplétés en SKR-1/2, la cellule MS se différencie en EMS, et produit du mésoderme mais aussi de l'endoderme de la même manière que le produirait la cellule EMS (Du et al. 2014, 2015). Si des niveaux protéiques de SKN-1 demeurent élevés pendant deux cycles de division après la division de EMS, alors deux phénomènes de réitération de EMS peuvent se produire (Du et al. 2014, 2015). Il a par ailleurs été montré que les ubiquitines ligases basées sur les cullines CUL-1 et CUL-2 induisent la dégradation de OMA-1 (Du et al. 2015; Shirayama et al. 2006). La stabilisation de OMA-1 observée en absence de ces ubiquitine ligases aboutirait à la stabilisation de SKN-1 (**fig. 30**). Ceci est cohérent avec le phénotype des embryons *oma-1(gof)* présentent aussi une différenciation de MS vers EMS, produisant un excès d'endoderme et mésoderme, en plus de la transformation du lignage C vers E (Du et al. 2015; Lin 2003).

#### 4) Inactivation de SKN-1 dans le blastomère P2 : rôle de PIE-1

Ainsi, GSK-3 et OMA-1 régulent la stabilité de SKN-1 dans le blastomère C (**fig. 30**). Un autre mécanisme permet non pas de contrôler les niveaux protéiques de SKN-1, mais de restreindre directement son activité pour limiter l'expression des gènes *med-1,2* au lignage EMS. Ce mécanisme fait intervenir la protéine PIE-1 qui réprime la transcription dans le lignage P (Seydoux and Fire 1994).

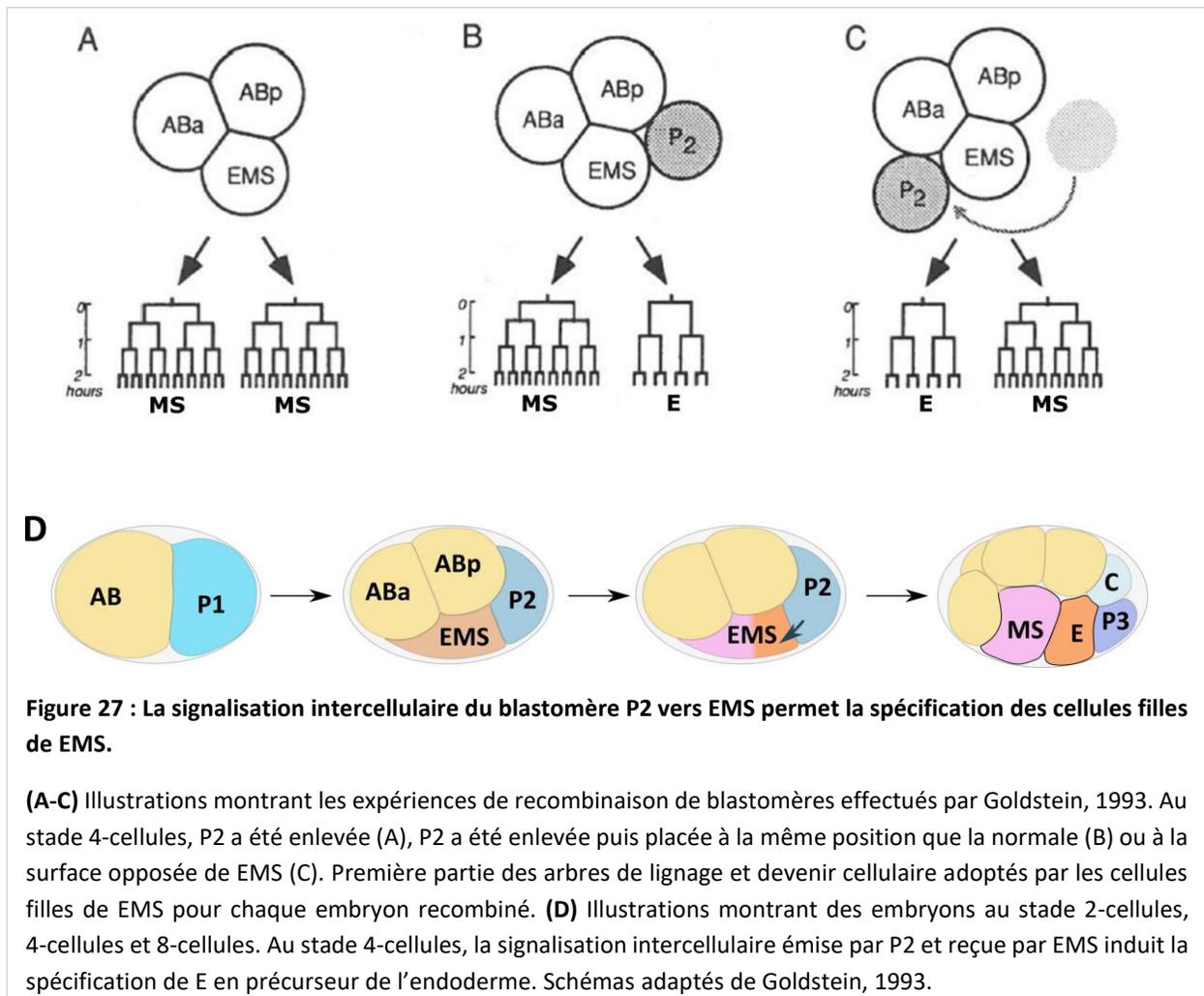
Alors que la protéine SKN-1 est enrichie dans les blastomères EMS et P2, son activité est nécessaire seulement dans la cellule EMS. Il a été montré que l'activité de SKN-1 dans P2 est inhibée par un facteur maternel appelé PIE-1 (Mello et al. 1992). Il est supposé que SKN-1 ne peut pas agir dans le blastomère P2 à cause du blocage général de la transcription imposée par PIE-1, spécifiquement dans cette cellule (Mello et al. 1992; Seydoux et al. 1996). En effet, la fonction principale de PIE-1 dans les noyaux des blastomères de la lignée germinale est d'inhiber la transcription des ARNm maternels (Tenenhaus et al. 2001). Cette fonction est essentielle pour préserver le destin cellulaire de la lignée germinale. Ainsi, dans des embryons mutants *pie-1*, la protéine SKN-1 devient active dans les cellules EMS et P2. L'expression de *med-1,2* est par la suite anormalement activée dans les descendants de P2 (Tenenhaus et al. 2001). Cela induit un excès

de cellules pharyngales et intestinales puisque le blastomère P2 adopte le même potentiel que EMS. Ce phénotype a conféré l'appellation « *pharynx-intestine-excess* » à PIE-1 (Bowerman 1995; McGhee 2013; Mello et al. 1992). Ainsi, PIE-1 exerce un rôle essentiel en inhibant la transcription des ARNm maternels : cela permet de bloquer la transcription des transcrits de *skn-1*, empêchant donc l'activation de gènes zygotiques tels que *med-1*, par le blastomère P2 (**fig. 30**).

#### v. Rôle de POP-1

Le blastomère EMS se divise pour produire la cellule MS donnant le mésoderme et la cellule E produisant l'endoderme. Comment le blastomère EMS peut-il, en se divisant de façon asymétrique et alors que MS et E expriment toutes les deux SKN-1, donner naissance à deux cellules filles adoptant chacun un lignage cellulaire spécifique ? Quel mécanisme moléculaire se cache derrière cette séparation de devenir cellulaires ?

Cette ségrégation s'explique par un signal intercellulaire émanant du blastomère P2 vers l'EMS qui dicte à la cellule fille postérieure de l'EMS, le blastomère E, de se spécifier en précurseur de l'endoderme (Goldstein 1992). Dans ses publications, Bob Goldstein a réalisé des expériences d'isolation et de recombinaison des blastomères individuels EMS et P2 en faisant varier leur organisation spatiale et leur temps de contact cellulaire (**fig. 27A-C**). Il a ainsi pu démontrer que les blastomères EMS et P2 doivent maintenir leur contact cellulaire lors de la première moitié du cycle cellulaire de EMS : cela permet la division asymétrique correcte de EMS de sorte à former les cellules E et MS (Goldstein 1993). Des blastomères EMS isolés ou des blastomères EMS mis en contact avec le blastomère P2 tardivement dans le cycle cellulaire de EMS (< 3 min avant la division de EMS) vont se diviser de façon symétrique produisant deux blastomères MS et menant à la perte de l'endoderme (**fig. 27A** ; (Goldstein 1992, 1993)). De plus, via des expériences de recombinaison de blastomères EMS et P2 isolés, il a été démontré que l'organisation spatiale de ces deux cellules était primordiale pour déterminer le devenir des cellules filles de EMS (**fig. 27**). Ainsi, lorsque EMS et P2 sont mises en contact l'une de l'autre avec une organisation spatiale différente de celle physiologique, la cellule fille de l'EMS qui provient de la région en contact avec P2 devient toujours la cellule E (**fig. 27** ; (Goldstein 1992)). De ce fait, le contact P2-EMS est requis pour spécifier la cellule E en précurseur de l'endoderme. Par ailleurs, le contact P2-EMS influence également l'orientation du plan de division de l'EMS, régulant ainsi l'asymétrie de ses cellules filles (Goldstein 1995).



Par la suite, des cribles génétiques ont permis de caractériser les constituants moléculaires de ce signal intercellulaire issu de P2 vers EMS. Il s'agit d'une combinaison de trois voies de signalisation cellulaire : Wnt, MAPK et Src.

Tout d'abord, la voie Wnt (*Wingless*) exerce un rôle majeur dans ce processus. Cette voie de signalisation cellulaire est essentielle pour de nombreux processus cellulaires impliqués dans le développement des organismes tels que la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire ou encore le renouvellement des cellules souches (pour revue : (Steinhart and Angers 2018)). Chez *C. elegans*, des cribles génétiques ont identifié plusieurs facteurs de la voie Wnt conservés et impliqués dans la spécification des blastomères E et MS. Il s'agit des gènes *mom* (pour more mesoderm), *wrm-1* (pour wormadillo), *apr-1* (pour APC-related) et *gsk-3*, un homologue de GSK-3 $\beta$  (pour revue : (Thorpe, Schlesinger, and Bowerman 2000)). Les gènes *mom-2*, *mom-1* et *mom-5* encodent respectivement les

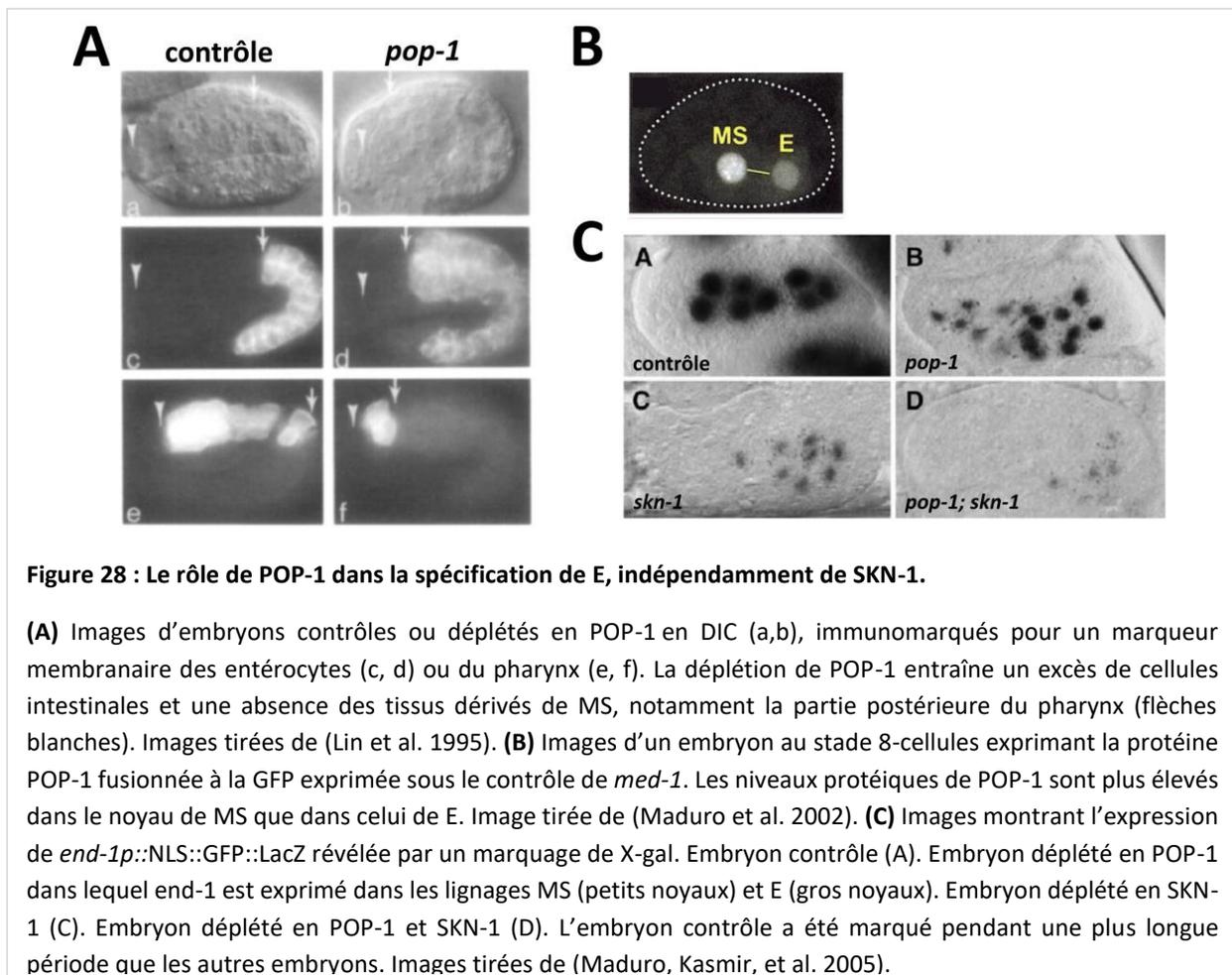
homologues de la protéine Wnt (*wingless int*, 34% d'identité), la protéine impliquée dans la sécrétion de Wnt nommée Porcupine (29% d'identité), et le récepteur de la voie Frizzled (37% d'identité) (Rocheleau et al. 1997). Le gène *wrm-1* code pour un homologue de la  $\beta$ -caténine. Enfin, le gène *apr-1* encode la protéine homologue au suppresseur de tumeur APC (*adenomatous polyposis coli*) (pour revue : (Thorpe et al. 2000)).

Dans la signalisation intercellulaire de P2 vers EMS, MOM-1<sup>Porc</sup> et MOM-2<sup>Wnt</sup> sont sécrétées par le blastomère P2. En interagissant avec MOM-5<sup>Frz</sup> exprimé par le blastomère EMS, la voie Wnt est activée. Les embryons *mom-1(null)*, *mom-2(null)* et *mom-5(null)* présentent un excès de cellules du pharynx et une absence de cellules intestinales (Thorpe et al. 1997). Des expériences d'isolation du blastomère E ont montré que celui-ci adopte le destin de la cellule MS dans les embryons *mom* : il produit du mésoderme au lieu de l'endoderme (Thorpe et al. 1997). Dans les embryons *mom*, les descendants de E présentent le même rythme de divisions et le même comportement cellulaire que les descendants de MS. Les cellules Ea et Ep ne gastrulent pas et elles se divisent de façon synchronisée avec MSa et MSp (Thorpe et al. 1997). Des expériences de recombinaison de blastomères ont permis de révéler que les protéines MOM-1, MOM-2 et MOM-5 sont nécessaires pour la signalisation de P2 vers l'EMS afin de spécifier l'endoderme (Rocheleau et al. 1997; Thorpe et al. 1997). Par ailleurs, les embryons *mom* ne s'allongent pas et subissent des défauts sévères de morphogenèse. En outre, ils présentent également des défauts d'orientation de l'axe de division de l'EMS (Rocheleau et al. 1997; Thorpe et al. 1997).

L'absence de différents acteurs de la voie Wnt induit un phénotype similaire aux mutants *mom*. Ainsi, les embryons déplétés en WRM-1 <sup>$\beta$ -caténine</sup> n'ont pas de cellules intestinales et présentent un excès de cellules du pharynx (Rocheleau et al. 1997). Comme pour les embryons *mom*, leur blastomère E a adopté le devenir de la cellule MS ; les descendants de E se divisent plus rapidement que dans les embryons contrôles. De plus, environ 26% des embryons déplétés en APR-1<sup>APC-related</sup> adoptent le même phénotype (Rocheleau et al. 1997). La fonction de APR-1 devient critique quand les protéines MOM-2 et MOM-5 ne sont pas présentes (Rocheleau et al. 1997). Ainsi, les protéines MOM, WRM-1 et APR-1 exercent un rôle important dans la spécification de E en endoderme. Toutefois, alors que les protéines MOM ont une fonction dans l'orientation de l'axe de division de l'EMS, WRM-1 et APR-1 ne sont pas impliquées dans ce processus (Rocheleau et al. 1997). Par ailleurs, ces résultats suggèrent la présence de deux voies parallèles. La première fait intervenir MOM-1, MOM-2 et MOM-5 tandis que la deuxième implique APR-1. Les deux voies convergent parallèlement pour activer l'activité de WRM-1 (Rocheleau et al. 1997).

Par ailleurs, il a été décrit qu'environ 20% des embryons déplétés en GSK-3 ne produisent pas d'intestin (Schlesinger et al. 1999). En l'absence de GSK-3, 44% des blastomères E isolés adoptent un destin similaire à la cellule MS, ce qui induit un excès de tissus dérivés de ce lignage (Schlesinger et al. 1999). La faible proportion des embryons déplétés en GSK-3 qui ne produisent pas d'intestin est expliquée par le fait que le blastomère C peut, quant à lui, adopter une identité intestinale ((Maduro et al. 2001) et voir la partie ci-dessus [iv. 2](#))). Ainsi, GSK-3 exerce une double fonction antagoniste vis-à-vis de la production de l'endoderme : un rôle inhibiteur de l'endoderme dans le lignage C et un rôle activateur de l'endoderme dans la cellule EMS. De plus, GSK-3 est aussi capable de réguler l'axe de division du blastomère EMS, comme les protéines MOM (Schlesinger et al. 1999).

Comment ces facteurs impliqués dans la voie Wnt promeuvent-ils la spécification de l'endoderme ? Des expériences d'épistasie ont montré que les protéines MOM, GSK-3 et WRM-1 fonctionnent ensemble au sein d'une même voie de signalisation. Même si les interactions directes entre les différents acteurs ne sont pas encore décrites, GSK-3 est en amont de WRM-1 et régule positivement



la voie (Nakamura et al. 2005). Ce rôle positif de GSK-3 contraste avec les rôles négatifs de GSK-3 $\beta$  décrits dans la voie Wnt canonique chez la drosophile, le xénope et les mammifères (pour revue : (Steinhart and Angers 2018)). Dans la signalisation de P2 vers EMS chez *C. elegans*, la voie Wnt permet *in fine* de réguler l'activité du facteur de transcription nommé POP-1 (Rocheleau et al. 1997). Le gène *pop-1* (pour posterior pharynx-defective) encode un homologue de dTCF/Pangolin de la drosophile et des membres de la famille TCF/LEF, décrits comme les facteurs de transcription qui médient les changements de l'expression génique induits par le signal Wnt (Rocheleau et al. 1997; Shin et al. 1999).

Le rôle de POP-1 repose principalement sur des différences graduelles de son enrichissement nucléaire (Lin, Hill, and Priess 1998; Lin, Thompson, and Priess 1995). En effet, dans des embryons contrôles, les niveaux nucléaires de POP-1 sont plus élevés dans la cellule MS par rapport à la cellule E (**fig. 28B** ; (Lin et al. 1998; Maduro, Lin, and Rothman 2002; Rocheleau et al. 1997; Thorpe et al. 1997)). Dans les embryons *mom*, *wrm-1* et *apr-1*, les niveaux nucléaires de POP-1 deviennent symétriques entre E et MS (Rocheleau et al. 1997; Thorpe et al. 1997). Ainsi, le signal intercellulaire P2  $\rightarrow$  EMS entraîne l'asymétrie de l'enrichissement nucléaire de POP-1. Il a été montré que cette asymétrie est due à l'induction de l'export nucléaire de POP-1 dans le blastomère E (Shetty et al. 2005). Au sein de la cellule MS, qui est issue de la partie de la cellule EMS qui n'était pas en contact avec P2, POP-1 ne subit pas d'export nucléaire et reste enrichi dans le noyau. En l'absence de POP-1, le blastomère EMS se divise pour donner naissance à deux cellules E. Cela révèle une transformation du lignage MS en lignage E (Lin et al. 1995). De ce fait, les embryons *pop-1* développent un excès de cellules intestinales associé à une absence de tissus issus du lignage MS (**fig. 28A**), notamment pas de pharynx postérieur, d'où le nom de POP-1 « posterior pharynx defective ». Il a été montré que l'absence de POP-1 entraîne une augmentation de l'expression des gènes spécifiques de l'endoderme (*end-1*, *end-3*) dans le lignage MS (Maduro, Kasmir, et al. 2005; Maduro et al. 2002; Shetty et al. 2005). Dans le blastomère MS, POP-1 fonctionne donc en tant que répresseur transcriptionnel pour empêcher l'expression des gènes spécifiques du lignage E et inhiber la spécification anormale en endoderme (Calvo et al. 2001). Au contraire, il a aussi été observé que l'absence de POP-1 entraîne une diminution de l'expression de *end-1* et *end-3* dans le lignage E, révélant ainsi un rôle activateur de POP-1 sur la transcription des gènes de l'endoderme dans E. La faible quantité de POP-1 présente dans le noyau du blastomère E lui permet d'interagir avec la protéine nucléaire SYS-1, une  $\beta$ -caténine divergente, et d'activer la production de l'endoderme (Huang et al. 2007; Maduro et al. 2002; Phillips et al. 2007). En cas d'absence de SKN-1 ou de POP-1, le gène *end-1* est exprimé respectivement dans 51% ou 88% des embryons (Maduro, Kasmir, et al. 2005). En revanche, seulement 21% des embryons déplétés à la fois en SKN-1 et POP-1 expriment *end-1*. Ces résultats révèlent une

expression indépendante de *end-1* qui est en partie contrôlée par POP-1 (**fig. 28C** ; (Maduro, Kasmir, et al. 2005)). Ainsi, la protéine POP-1 est essentielle pour différencier l'acquisition de l'identité cellulaire entre les deux cellules filles du blastomère EMS en exerçant deux rôles antagonistes sur l'expression des facteurs de spécification intestinale END-1 et END-3.

La voie Wnt n'agit pas seule pour réguler la phosphorylation et le gradient nucléaire de POP-1. En effet, deux autres voies de signalisation sont impliquées : les voies MAPK et Src. Au sein de la voie MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), la protéine MOM-4, l'homologue de la kinase de MAPK, est capable de phosphoryler et ainsi d'activer LIT-1<sup>MAPK</sup> (Shin et al. 1999). Les embryons porteurs d'une mutation hypomorphe de *lit-1* ne développent pas d'intestin, d'où l'appellation « LIT-1 » pour « loss of intestine ». Lorsqu'elle est phosphorylée, LIT-1, qui forme un complexe avec WRM-1, phosphoryle à son tour POP-1, induisant ainsi son export nucléaire de E (Shin et al. 1999).

La voie Src intervient également pour réguler la spécification de l'endoderme lors de la signalisation P2 → EMS, mais aussi pour contrôler l'orientation correcte de l'axe de division de l'EMS (Bei et al. 2002). Dans cette voie, le gène *mes-1* encode un récepteur transmembranaire tandis que le gène *src-1* encode la protéine homologue au protooncogène c-SRC (Bei et al. 2002). Les embryons *src-1* développent tous un intestin (Maduro, Kasmir, et al. 2005). Cependant, ils ne s'allongent pas correctement (Bei et al. 2002). Si la déplétion de SRC-1 est associée à des mutations de composants de la voie Wnt, alors une aggravation du phénotype de perte de l'endoderme est observée (Maduro, Kasmir, et al. 2005). Ainsi, les deux voies fonctionnent en parallèle pour spécifier E en endoderme. Par ailleurs, la voie Src est également requise pour l'asymétrie correcte des divisions des descendants du lignage P : P2 et P3 (Bei et al. 2002; Strome et al. 1995).

Pour conclure, les voies Wnt, MAPK et Src convergent ensemble vers la régulation de la localisation et de l'activité de l'effecteur POP-1 dans le but de contrôler la spécification de E et de différencier le devenir cellulaire des cellules filles de EMS. Ces voies interviennent lors d'une signalisation de P2 vers EMS au stade 4-cellules (**fig. 30**).

#### vi. Rôle de PAL-1

SKN-1 et POP-1 sont capables d'induire l'expression de *end-1* et *end-3* dans le blastomère E. Pourtant, en l'absence de SKN-1 et de POP-1, 30% des embryons présentent toujours des cellules intestinales (Maduro, Kasmir, et al. 2005). Ainsi, il existe une voie de signalisation supplémentaire

permettant de produire de l'endoderme. Celle-ci implique la protéine nommée PAL-1, un homologue de Caudal, un facteur de transcription impliqué dans le développement du pôle postérieur chez la drosophile (Waring and Kenyon 1990, 1991).

En l'absence de SKN-1, de POP-1 et de PAL-1, aucun embryon ne présente des cellules intestinales (Maduro, Kasmir, et al. 2005). Cela révèle la contribution de PAL-1 dans la spécification de E. Cette contribution est normalement masquée par la voie de spécification intestinale majeure : SKN-1 -> MED-1,2 -> END-1,3. En effet, l'absence seule de PAL-1 ou de POP-1 ou l'absence de ces deux facteurs n'induisent pas de défaut majeur de spécification de l'endoderme (Maduro, Kasmir, et al. 2005).

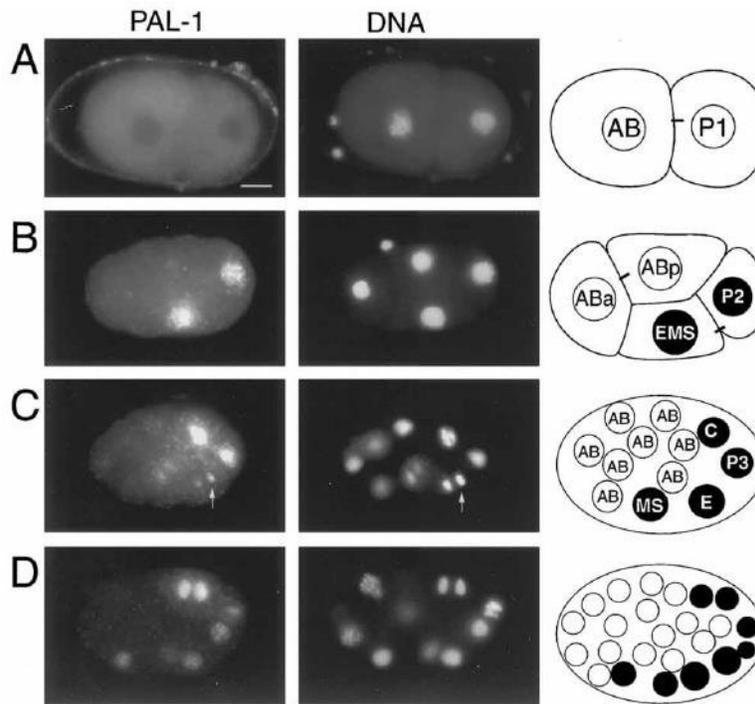
Ces résultats sont surprenants puisque le facteur PAL-1 a d'abord été caractérisé comme étant un activateur de la spécification du lignage C (Hunter and Kenyon 1996). PAL-1 est requise pour le développement normal des descendants de C. En effet, les embryons déplétés en PAL-1 ne présentent pas de tissus dérivés du blastomère C tels que des cellules de l'épiderme et de muscle situés dans la partie postérieure de l'embryon. En revanche, ils n'ont pas de phénotype discernable dans l'endoderme (Hunter and Kenyon 1996).

La distribution de la protéine PAL-1 a été caractérisée dans l'embryon précoce par des expériences d'immunofluorescence (**fig. 29** ; (Hunter and Kenyon 1996)). Ses niveaux protéiques endogènes n'ont toutefois pas encore été décrits dans la littérature. Dans l'embryon précoce, la protéine PAL-1 est localisée dans les blastomères P2 et EMS, puis dans leurs descendants respectifs, les cellules C et P3 ainsi que E et MS (**fig. 29B-C** ; (Hunter and Kenyon 1996)). Dans les stades entre 15- et 24-cellules, les niveaux protéiques de PAL-1 demeurent stables dans les descendants de P3. En revanche, ils augmentent dans les descendants de C et au contraire, diminuent dans les descendants de MS et E (**fig. 29D** ; (Hunter and Kenyon 1996)).

Il a été montré que la présence ectopique de PAL-1 suffit pour induire la production de tissus dérivés de C dans l'ensemble de l'embryon (Hunter and Kenyon 1996). Toutefois, PAL-1 est normalement présente dans la cellule EMS qui ne produit pourtant pas de tissus dérivés de C. Dans les blastomères C et EMS, les protéines PAL-1 et SKN-1 sont toutes les deux présentes. Pourtant, SKN-1 et PAL-1 induisent la spécification de cellules intestinales dans le lignage E tandis que PAL-1 induit la spécification de cellules musculaires et épidermales dans le lignage C (Bowerman et al. 1993; Hunter and Kenyon 1996). Ce paradoxe pourrait être expliqué par un équilibre différent entre les actions antagonistes de PAL-1 et SKN-1 dans les lignages E et C.

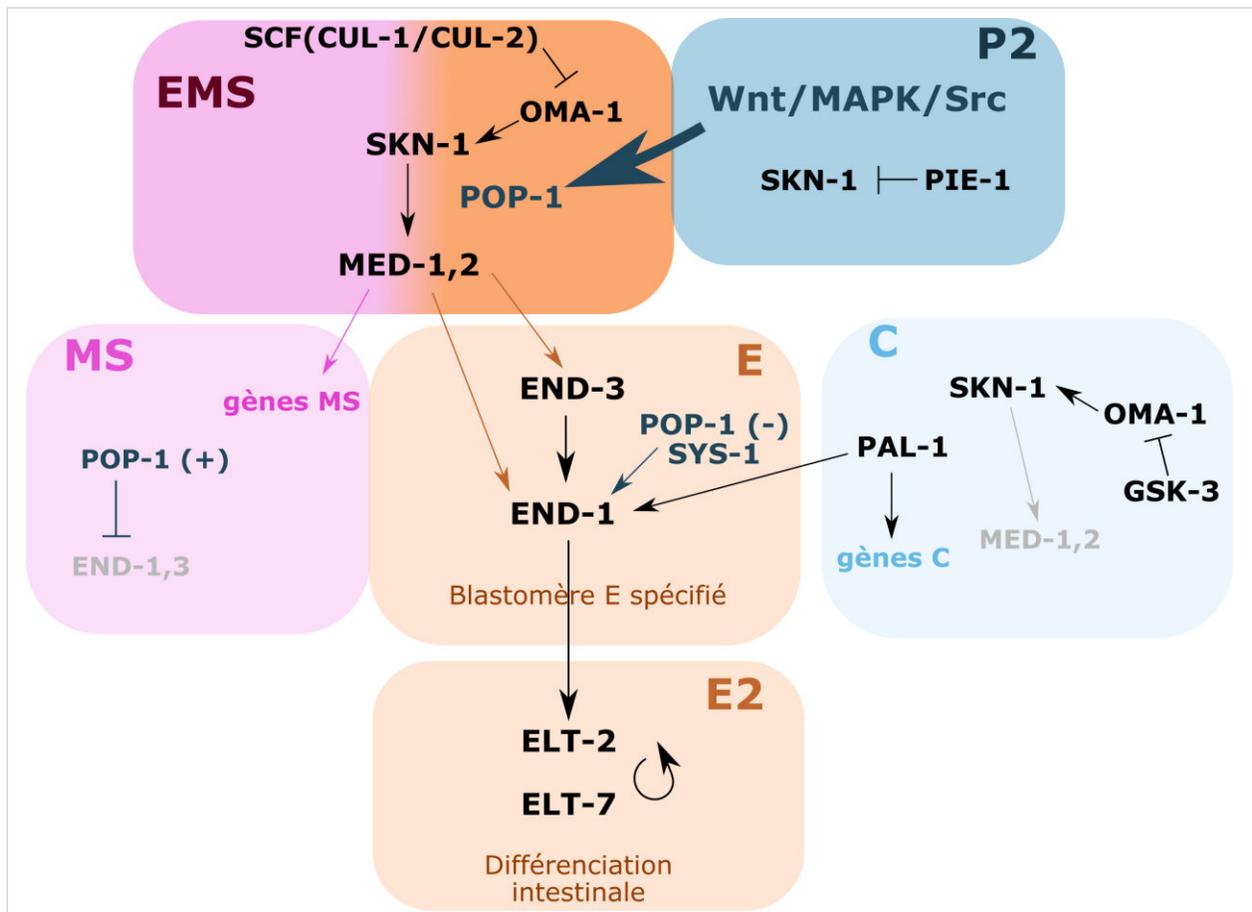
Ainsi, nous avons vu précédemment l'importance des mécanismes limitant la stabilisation de SKN-1 dans C ((Lin, 2003; Maduro et al., 2001; Schlesinger et al., 1999) ; voir les paragraphes de la partie **iv.**). Il a également été proposé que PAL-1 pourrait lier les gènes *end* afin réprimer leur expression dans le lignage C (Maduro, Kasmir, et al. 2005).

En revanche, les mécanismes moléculaires par lesquels PAL-1 permet la production d'endoderme dans les embryons déplétés en SKN-1 et POP-1 ne sont pas décrits à ce jour. Maduro et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que PAL-1 pourrait perdre son activité répressive des gènes *end* dans le blastomère E pour au contraire activer leur transcription, mais les mécanismes qui pourraient expliquer ce changement de comportement restent élusifs (Maduro, Kasmir, et al. 2005). Ainsi, le facteur PAL-1, avec SKN-1 et POP-1, participe à la production de l'endoderme par le blastomère E (**fig. 30**).



**Figure 29 : Localisation de la protéine PAL-1 au cours des premières divisions embryonnaires.**

Images d'embryons immunomarqués en fluorescence pour la protéine PAL-1 et l'ADN (marquage au DAPI) aux stades 2-cellules (A), 4-cellules (B), 8-cellules (C) et 24-cellules (D). Schémas d'embryons aux mêmes stades avec l'enrichissement nucléaire de PAL-1 indiqué en noir. Images tirées de Hunter and Kenyon, 1996.



**Figure 30 : Voies de signalisation impliquées dans la spécification de E en précurseur de l'endoderme.**

La spécification intestinale débute dès le stade embryonnaire 4-cellules. Au sein du blastomère EMS, le facteur SKN-1 active l'expression des gènes *med-1,2*. Les MED-1,2 activent à leur tour l'expression des gènes *end-1,3*. Ces derniers sont les premiers gènes à être exprimés dans le lignage E : le blastomère E est alors spécifié. Les facteurs END-1,3 induisent l'expression des gènes *elt-2,7* dans les cellules E2, responsables de l'expression des gènes du programme de différenciation intestinale. Dans le blastomère EMS, les niveaux protéiques de SKN-1 sont restreints notamment par les ubiquitines ligases, constituant les complexes SCF de type cullines CUL-1 et CUL-2, via la dégradation de OMA-1. Dans le blastomère P2, l'activité transcriptionnelle de SKN-1 est inhibée par PIE-1. Dans le blastomère C, SKN-1 est inhibée par GSK-3, directement ou indirectement via OMA-1. Une signalisation intercellulaire provenant du blastomère P2 vers la cellule EMS permet la différenciation du devenir des cellules filles, MS et E, en régulant les niveaux nucléaires de POP-1. Dans la cellule MS, les niveaux nucléaires élevés de POP-1 inhibent l'expression des gènes *end-1,3*. Dans le blastomère E, les niveaux nucléaires faibles de POP-1, en interaction avec SYS-1, activent la transcription des gènes *end-1,3*. Enfin, PAL-1 contribue à l'expression des gènes *end-1,3* dans le blastomère E et promeut l'activation des gènes relatifs au lignage C au sein du blastomère C.

### c. Les facteurs ELT-2 et ELT-7, acteurs majeurs de la différenciation des entérocytes

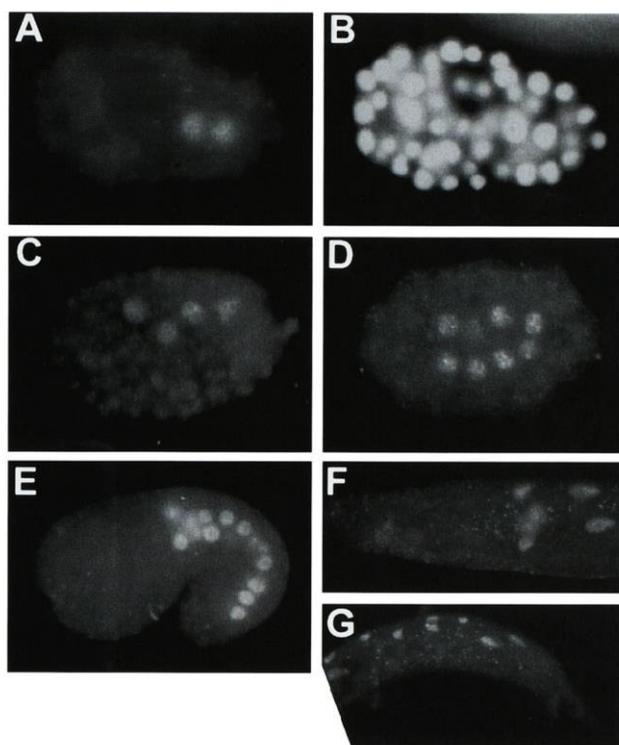
Les gènes *end-1,3* sont les premiers gènes à être exprimés dans les cellules descendants de E marquant leur spécification intestinale. END-1,3 activent à leur tour l'expression du facteur de transcription *elt-2*. Il a été montré que END-1 est capable de lier le promoteur *elt-2 in vitro* (Wiesenfahrt et al. 2016). Par ailleurs, une étude réalisée par Raj et ses collaborateurs montre que *end-1* doit atteindre un seuil d'expression pour activer *elt-2* (Raj et al. 2010). Ils ont mis en évidence un système « ON/OFF » sur l'expression de *elt-2* influencée par *end-1*, en amont. Par ailleurs, le nombre de cellules exprimant *end-1* influence aussi l'activation de *elt-2*. Ils ont déterminé que les embryons présentant une expression de *end-1* dans 4 ou plus de descendants de E, exprimeront *elt-2* par la suite.

La protéine ELT-2 (*erythroid/erythrocyte-like transcription factor*) est un régulateur majeur des gènes impliqués dans la différenciation, le maintien et la fonction de l'intestin du nématode (Fukushige et al. 1999; Fukushige, Hawkins, and McGhee 1998; McGhee et al. 2009). De plus, la présence ectopique de ELT-2 est suffisante pour induire l'expression ectopique de gènes spécifiques de l'intestin (Fukushige et al. 1998; McGhee et al. 2007, 2009). Il est considéré comme le facteur principal pour la différenciation intestinale chez *C. elegans*. Une mutation nulle de *elt-2* induit une létalité larvaire entraînée par une maturation aberrante de l'intestin (Fukushige et al. 1998). Les larves *elt-2(null)* présentent des microvillosités irrégulières et courtes observées par MET. De plus, ce phénotype est associé à la présence de bactéries non digérées dans la lumière intestinale, générant une obstruction intestinale et induisant la létalité larvaire.

*elt-2* est exprimé à partir du stade E2, puis son expression est maintenue dans l'intestin au cours de l'embryogénèse et persiste encore à la vie larvaire et adulte (**fig. 31** ; (Fukushige et al. 1999, 1998)). Par ailleurs, la protéine ELT-2 peut elle-même activer l'expression de son gène. En effet, il a été montré qu'elle est capable de lier son propre promoteur *in vitro* (Wiesenfahrt et al. 2016).

La protéine ELT-2 permet l'induction de l'expression de nombreux gènes intestinaux (McGhee et al. 2007, 2009). Il fonctionne en redondance partielle avec ELT-7 (Dineen et al. 2018; Sommermann et al. 2010). La protéine ELT-7 est un autre composant clé du programme de développement intestinal (Sommermann et al. 2010). Comme *elt-2*, son expression est activée par les protéines END-1,3 (Sommermann et al. 2010). Par ailleurs, *elt-7* est exprimé avant *elt-2*. De plus, la forte expression de *elt-7* est suffisante pour activer la différenciation de l'intestin dans des autres lignages que E. *elt-7* reste exprimé

tout au long de la vie post-embryonnaire (Sommermann et al. 2010). Toutefois, alors que les larves *elt-2(null)* présentent un phénotype intestinal, ce n'est pas le cas pour les larves *elt-7(null)* (McGhee et al. 2009; Sommermann et al. 2010). En revanche, la perte de fonction aggrave le phénotype intestinal des larves *elt-2(null)* (Sommermann et al. 2010). En outre, les facteurs ELT-2 et ELT-7 collaborent pour l'expression de certains gènes intestinaux, notamment l'enzyme GES-1, qui est un des premiers marqueurs terminaux de la différenciation intestinale (Dineen et al. 2018; Sommermann et al. 2010). Toutefois, l'absence de ELT-2 perturbe de manière plus importante le transcriptome des larves que le fait l'absence de ELT-7 (Dineen et al. 2018). Ainsi, ELT-7 est partiellement redondant avec ELT-2, mais ELT-2 est considéré comme le facteur principal impliqué dans la différenciation intestinale chez *C. elegans*.



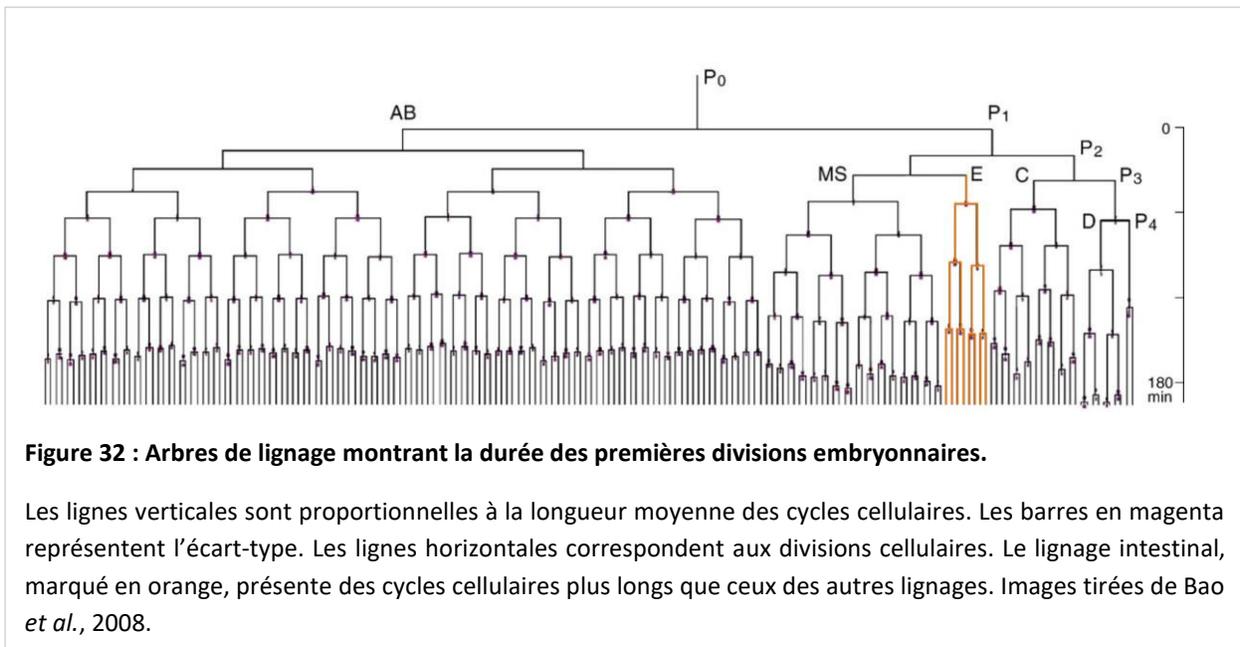
**Figure 31 : Localisation de la protéine ELT-2 dans les cellules intestinales du nématode.**

Détection de la protéine ELT-2 par immunomarquage dans les embryons et adultes. (A) Immunomarquage de ELT-2 dans un embryon au stade 26-cellules montrant la présence de la protéine ELT-2 dans les cellules E2. (B) Marquage au DAPI dans le même embryon qu'en A. (C-E) Immunomarquage de ELT-2 dans des embryons respectivement aux stades E4, E8 et E20. (F-G) Immunomarquage de ELT-2 respectivement dans la partie antérieure ou postérieure de l'intestin d'un ver adulte. Images tirées de Fukushige *et al.*, 1998.

## d. Régulation des divisions des entérocytes

### i. Spécificités du lignage intestinal

Chez *C. elegans*, le lignage cellulaire complet et invariant a été décrit et publié par John Sulston en 1983 (Sulston et al. 1983). Cette étude historique a révélé que la longueur des cycles cellulaires était spécifique de la descendance de chaque blastomère. Ainsi, les différents lignages ont des rythmes variés de divisions cellulaires (**fig. 32**).



Au début de l'embryogenèse, les cycles cellulaires oscillent entre une phase de réplication de l'ADN (phase S) et une phase de mitose (phase M). Ils utilisent la contribution maternelle des régulateurs du cycle. La caractérisation du lignage complet du nématode a révélé que les cycles cellulaires des descendants de E étaient plus longs que ceux des autres cellules embryonnaires (**fig. 32** ; (Bao et al. 2008; Sulston et al. 1983)). En effet, les cellules filles de E, nommées Ea et Ep, sont les premières cellules dans l'embryon *C. elegans* à introduire une phase G2 dans leur cycle de division (Edgar and McGhee 1988; Lee et al. 2016). Cette phase de croissance allonge ainsi la durée des cycles de division intestinaux, à l'inverse des autres lignages qui n'en présentent pas (**fig. 32**). Par ailleurs, une étude suggère que la phase G1 apparaîtrait au stade E16 de l'intestin en devenir (Boxem and van den Heuvel 2001).

Dans les embryons contrôlés, à 20°C, les longueurs des cycles cellulaires de E, E2, E4, E8 et E16 sont respectivement en moyenne de 19, 40, 44, 70 et 140 minutes (**fig. 32** ; (Bao et al. 2008)).

## ii. Lien entre la spécification et les divisions intestinales

Une spécification intestinale correcte est essentielle pour la régulation des divisions intestinales (**fig. 30**).

Aux prémices du développement intestinal chez *C. elegans*, une signalisation intercellulaire de P2 vers EMS permet la spécification de l'endoderme en produisant un gradient nucléaire du facteur de transcription POP-1 (**fig. 30**). La voie Wnt compose cette signalisation et y est essentielle. Il a été montré qu'elle est également impliquée dans l'allongement de la durée du cycle dans les cellules filles de E (Robertson, Medina, and Lin 2014). En effet, la voie Wnt active la transcription de *wee-1.1*, codant pour une kinase inhibitrice du cycle. Ainsi, la signalisation Wnt de P2 vers EMS régule non seulement la spécification de l'endoderme, mais rallonge aussi le rythme de divisions de Ea et Ep.

En 2017, Choi et ses collaborateurs ont publié une étude montrant que des défauts de spécification intestinale, relatifs à une expression diminuée de *med-1*, *med-2*, *end-1* et/ou *end-3*, perturbent le rythme de divisions des descendants de E (Choi, Broitman-Maduro, and Maduro 2017). Dans ces embryons, les descendants de E se divisent alors plus vite et davantage. Par ailleurs, ils ont révélé que plus les défauts de spécification intestinale sont sévères, moins de descendants de E adoptent un destin intestinal et se différencient dans l'embryon (Choi et al. 2017). Dans ce cas, les embryons présentent de nombreux descendants de E visibles par l'expression de *end-1*, mais peu d'entre eux expriment plus tard *elt-2*, le marqueur de la différenciation intestinale. Ainsi, la variabilité de l'expression des facteurs de transcription intestinaux comporte des conséquences sur le nombre d'entérocytes final. Ainsi, Choi et ses collaborateurs expliquent que la sévérité du défaut de spécification perturbe, via un continuum de phénotypes, le nombre d'entérocytes et l'expression de *elt-2* (Choi et al. 2017).

Lors de la description des divisions embryonnaires chez *C. elegans*, il a été proposé que chaque lignage a sa propre horloge endogène et autonome de cycle cellulaire (Deppe et al. 1978). Une observation peut corroborer cette hypothèse. En effet, dans des embryons déplétés en GSK-3, la cellule Cp adopte le destin intestinal de E, en exprimant les facteurs de spécification spécifiques à l'endoderme (Maduro et al. 2001; Schlesinger et al. 1999; Shirayama et al. 2006). Le lignage intestinal dans les embryons déplétés en GSK-3 a été décrit (Segref et al. 2010) : les cellules descendantes de Cp adoptent alors un rythme de

division lent, similaire aux descendants de E. Cela suggère que chaque lignage renferme une horloge autonome de cycle cellulaire.

### iii. Principaux acteurs du cycle : contrôle de la vitesse et/ou du nombre de division

Plusieurs régulateurs sont importants pour le contrôle de la vitesse de division et/ou le nombre de division des descendants de E. Je détaillerai le rôle de certains d'entre eux et n'établirai pas ici une liste exhaustive de tous les acteurs du cycle cellulaire intestinal intervenant chez le nématode.

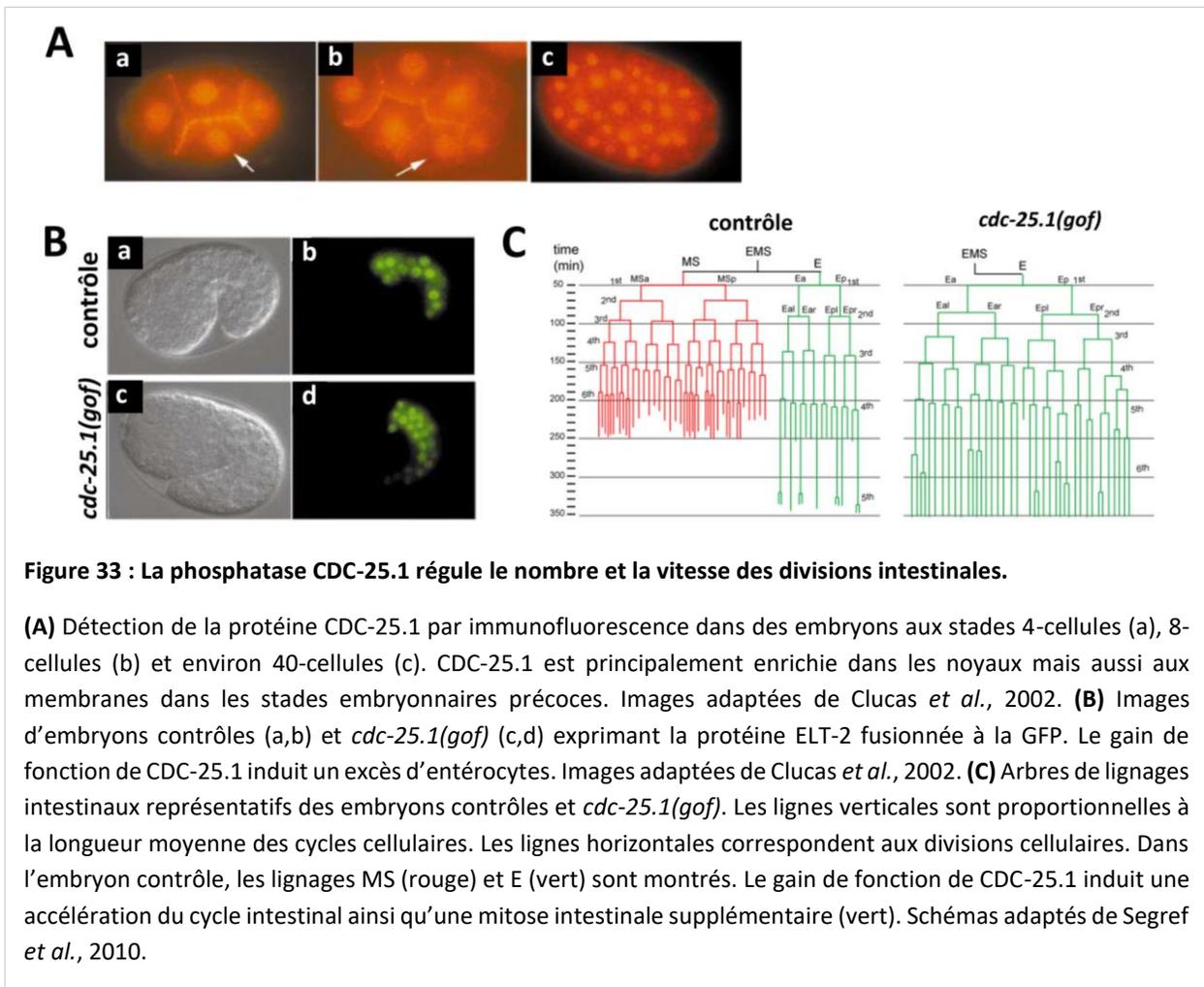
#### 1) La phosphatase CDC-25.1

La phosphatase CDC-25.1 exerce une fonction essentielle pour la régulation de la vitesse des divisions et du nombre de divisions au sein du lignage intestinal. CDC-25.1 est un des quatre homologues de CDC25 codés par le génome de *C. elegans* (Ashcroft et al. 1998). Chez l'être humain et la souris, les protéines Cdc25A, Cdc25B et Cdc25C, codées par trois gènes différents, sont impliquées dans les transitions G1/S et G2/M du cycle cellulaire. Elles peuvent exercer des rôles tissu-spécifiques (Draetta and Eckstein 1997). Les phosphatases Cdc25 promeuvent la progression du cycle cellulaire en déphosphorylant les kinases cyclines-dépendantes (Cdk) qui ont été phosphorylées et inactivées par la kinase Wee1 notamment (Lee et al. 2016).

Chez *C. elegans*, la localisation et la dynamique de la protéine CDC-25.1 endogène n'ont pas encore été caractérisées. Toutefois, des expériences d'immunofluorescence ont révélé que la protéine CDC-25.1 est localisée majoritairement dans les noyaux de toutes les cellules embryonnaires ainsi que dans la lignée germinale et les ovocytes, avec un faible signal membranaire dans les stades embryonnaires précoces (**fig. 33A** ; (Ashcroft et al. 1998; Clucas et al. 2002)). Elevée dans les stades précoces, son abondance diminue alors que le nombre de cellules embryonnaires augmente. En effet, CDC-25.1 repose sur une contribution maternelle.

Alors que la déplétion de CDC-25.1 entraîne une létalité embryonnaire (Ashcroft et al. 1999), son gain de fonction induit une hyperplasie intestinale (**fig. 33B,C**). Deux mutations *cdc-25.1(gof)* ont été décrites : *cdc-25.1(rr31)* et *cdc-25.1(ij48)* (Clucas et al. 2002; Kostić and Roy 2002). Ces mutations affectent un site de phosphodégéron et empêchent donc CDC-25.1 d'être reconnu par une ubiquitine ligase responsable de sa dégradation (Hebeisen and Roy 2008). La protéine CDC-25.1 persiste alors plus

longtemps que dans les conditions physiologiques. Les mutations *cdc-25.1(gof)* affectent seulement le lignage intestinal (Clucas et al. 2002; Kostić and Roy 2002). Les embryons *cdc-25.1(gof)* présentent une accélération des divisions des descendants de E et subissent une division intestinale supplémentaire (fig. 33B ; (Bao et al. 2008; Choi et al. 2017; Segref et al. 2010)). Ainsi, pendant le temps nécessaire aux embryons contrôles pour atteindre le stade E16, les embryons *cdc-25.1(gof)* se divisent une fois de plus et atteignent le stade « E32 ». Par la suite, quelques-unes de ces cellules se divisent à nouveau, de la même manière que certaines cellules se redivisent pour atteindre le stade E20 dans les embryons contrôles. Les mutations *cdc-25.1(gof)* conduisent *in fine* à un excès d'entérocytes différenciés qui expriment *elt-2* (fig. 33B).



## 2) LIN-23, le régulateur de CDC-25.1

Comme présenté brièvement dans le paragraphe précédent, la stabilité de la protéine CDC-25.1 doit être régulée finement au cours des divisions embryonnaires afin d'empêcher une hyperplasie intestinale. En effet, les mutations *cdc-25.1(gof)* ciblent un site de phosphodégron qui présente un motif de destruction conservé reconnu spécifique par les protéines  $\beta$ -TrCP (*beta-transducin repeats-containing protein*) (Hebeisen and Roy 2008). Ces mutations induisent ainsi la persistance de CDC-25.1 au sein de l'embryon. Les protéines  $\beta$ -TrCP servent de sous-unités de reconnaissance du substrat pour les ubiquitines ligases basées sur la culline CUL-1.

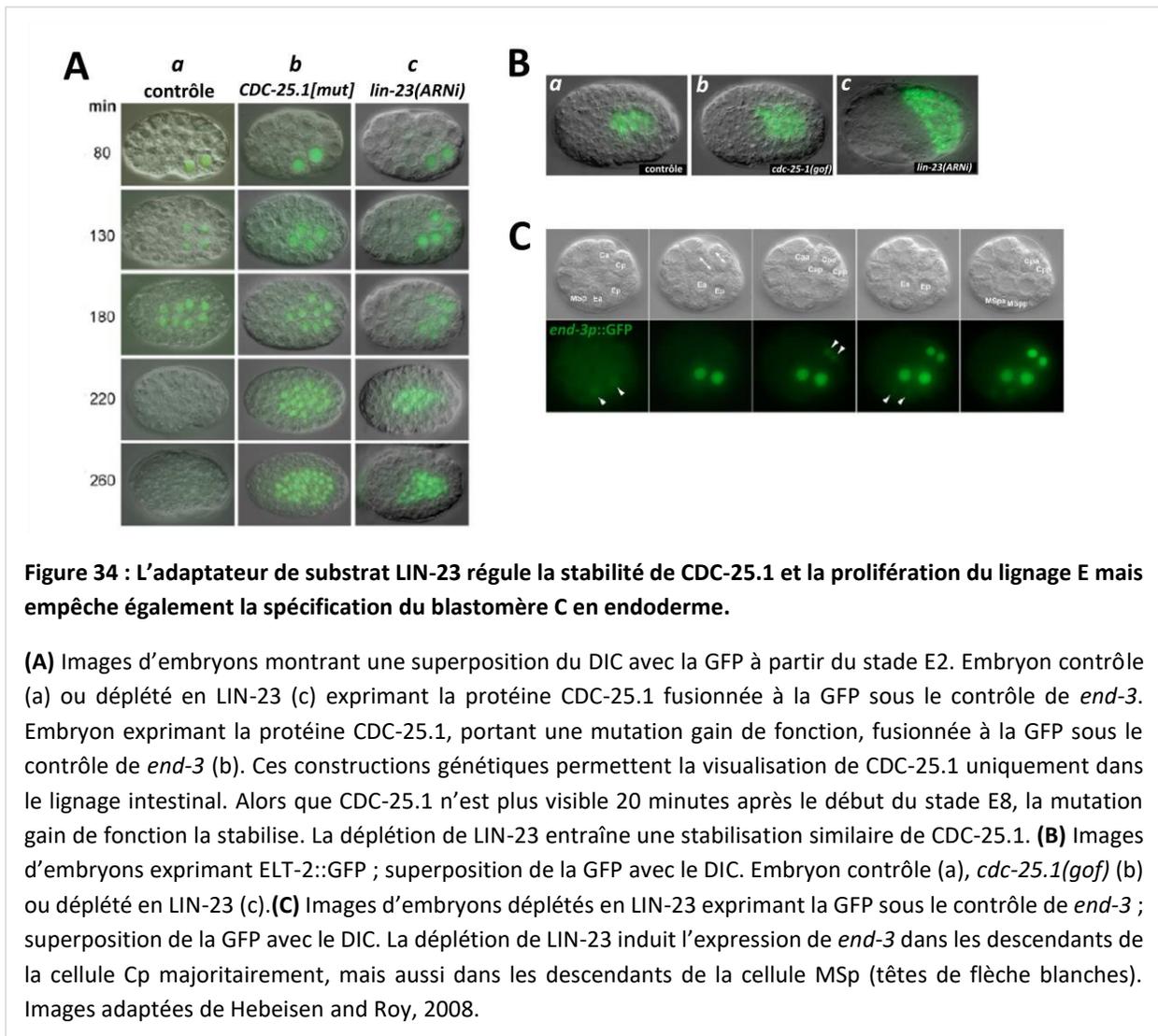
Chez *C. elegans*, un orthologue de  $\beta$ -TrCP est nommé LIN-23 (Kipreos, Gohel, and Hedgecock 2000). Cette protéine est décrite en tant que régulateur négatif du cycle cellulaire qui réprime les divisions cellulaires embryonnaires et post-embryonnaires (Kipreos et al. 2000). Les embryons mutants *lin-23(null)* ne s'allongent pas et présentent une hyperplasie sévère de tous les tissus embryonnaires conduisant à leur létalité (Kipreos et al. 2000).

Dans le lignage intestinal, la perte de fonction de LIN-23 induit une hyperplasie via deux mécanismes indépendants (**fig. 34** ; (Hebeisen and Roy 2008; Segref et al. 2010)). Tout d'abord, comme les embryons *cdc-25.1(gof)*, les embryons déplétés en LIN-23 présentent une accélération des cycles de division des descendants de E et subissent une division intestinale supplémentaire (Segref et al. 2010). Cette dérégulation du cycle cellulaire au sein du lignage E est probablement liée à la capacité de LIN-23 à réguler la dégradation protéique de CDC-25.1 en la ciblant spécifiquement (**fig. 34A** ; (Hebeisen and Roy 2008; Segref et al. 2010)). Il a en effet été montré que LIN-23 est capable d'interagir directement avec CDC-25.1 *in vitro* (Son et al. 2016). De plus, en absence de LIN-23, CDC-25.1 est stabilisée et perdure plus longtemps que dans les embryons contrôles (Hebeisen and Roy 2008; Segref et al. 2010).

Toutefois, l'hyperplasie intestinale induite par la perte de fonction de LIN-23 n'est pas seulement liée à la stabilisation de CDC-25.1. En effet, les embryons déplétés en LIN-23 présentent un nombre d'entérocytes nettement plus élevé que celui des embryons *cdc-25.1(gof)* (**fig. 34B** ; (Hebeisen and Roy 2008)). Outre l'hyperprolifération du lignage E, il a été montré que 60% des embryons déplétés en LIN-23 subissent également un défaut de spécification intestinale : la cellule Cp adopte le destin cellulaire du blastomère E et exprime *end-3* (**fig. 34C** ; (Hebeisen and Roy 2008)). Dans les embryons déplétés en LIN-23, le rythme de division des descendants de Cp est similaire à celui des descendants de E, donc plus rapide que dans les embryons contrôles (Segref *et al.*, 2010). En outre, dans 5% des embryons déplétés en LIN-23, la cellule fille postérieure de MS, nommée MSp, exprime ectopiquement *end-3* (**fig. 34C** ; (Hebeisen

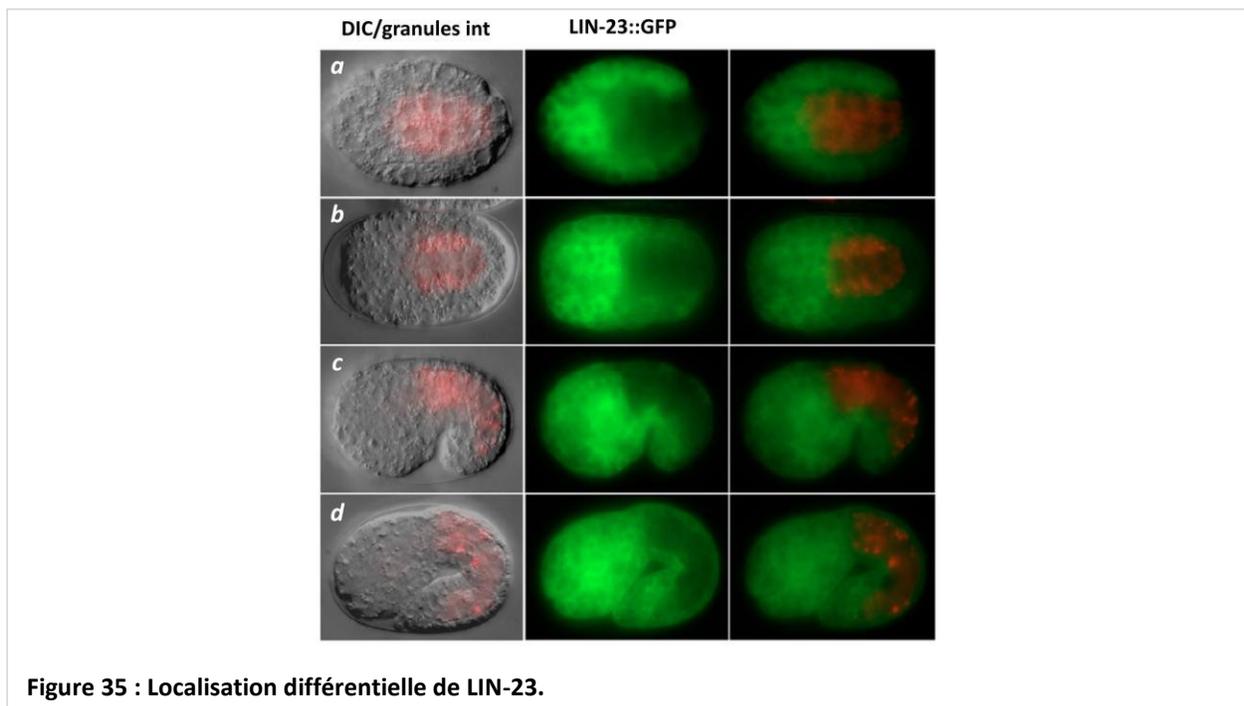
and Roy 2008)). Les descendants de MSp ne subissent pas une accélération de leur cycle de division (Segref et al. 2010).

Comment LIN-23 régule-t-il la spécification intestinale ? LIN-23, comme d'autres composants du complexe ubiquitine ligase contenant la culline CUL-1, exerce un rôle dans la dégradation de la protéine OMA-1 (Du et al. 2015). En effet, les embryons déplétés en LIN-23 présentent une stabilisation de OMA-1 au cours de l'embryogenèse précoce. Or, les embryons *oma-1(gof)* dans lesquels OMA-1 n'est pas dégradée montrent une stabilisation de SKN-1 dans le blastomère C ((Lin 2003) et voir partie [iv. 2](#))). Ainsi, même si l'interaction directe entre LIN-23 et OMA-1 n'a pas été caractérisée, il est possible que LIN-23 régule la spécification intestinale en contribuant à contrôler la dégradation de OMA-1 au sein du blastomère C. Par ailleurs, cette régulation expliquerait aussi l'expression ectopique de *end-3* dans les descendants de MSp. En effet, les embryons *oma-1(gof)* présentent une réitération du blastomère EMS :



la cellule MS adopte le devenir de l'EMS, le lignage MSp se convertit alors en lignage intestinal (Du et al. 2015).

Les niveaux endogènes et la distribution de la protéine LIN-23 n'ont pas été caractérisés jusqu'alors. Les transcrits maternels *lin-23* sont distribués de manière ubiquitaire dans l'embryon (Kipreos et al. 2000). La protéine de fusion LIN-23::GFP montre de forts niveaux protéiques dans la majorité des cellules embryonnaires. En revanche, de manière surprenante, elle est presque absente de l'intestin en devenir à partir du stade E4 (**fig. 35** ; (Hebeisen and Roy 2008)). Cette expression différentielle persiste jusqu'à la fin de l'embryogenèse.



### 3) La phosphatase CDC-25.2

Le génome de *C. elegans* code quatre phosphatases CDC-25. Alors que CDC-25.1 est impliquée dans la régulation du lignage intestinal avant E16, il a été montré qu'une deuxième phosphatase régule également les divisions des descendants de E. Il s'agit de la protéine CDC-25.2. La localisation et la

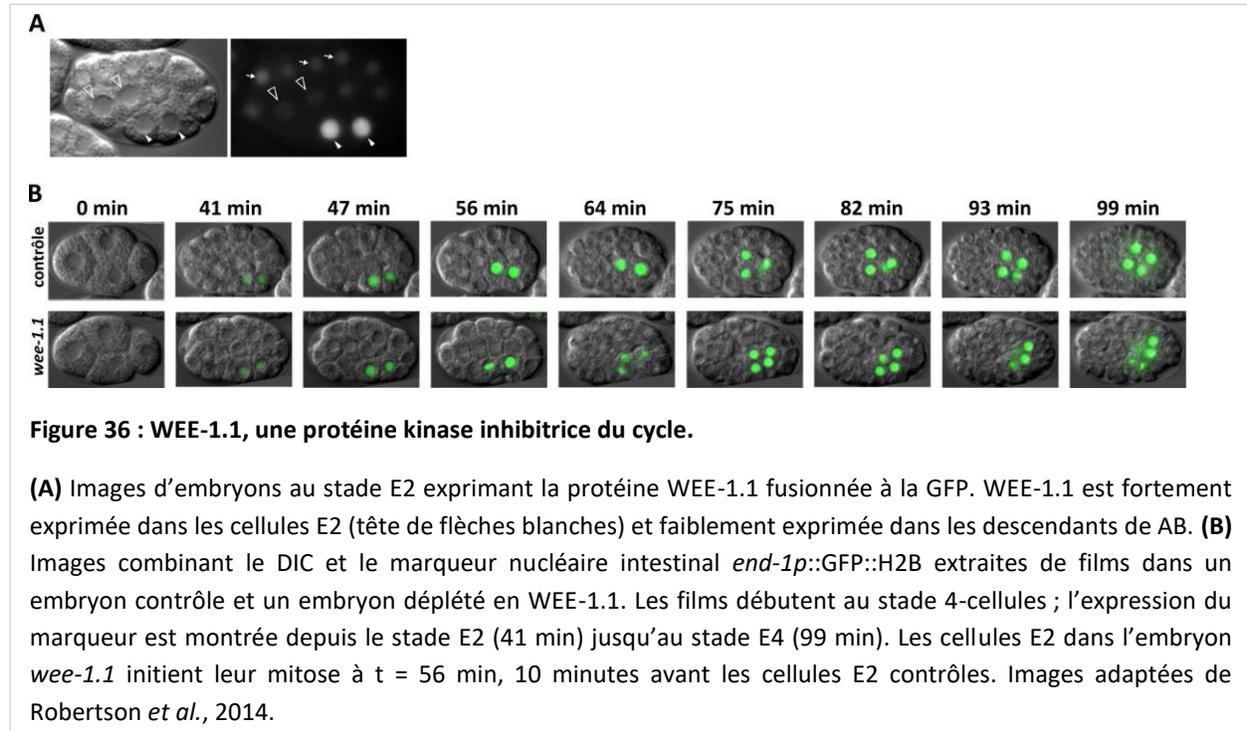
dynamique de la protéine CDC-25.2 endogène dans les embryons n'ont jusqu'alors pas été décrites dans la littérature.

Au contraire de CDC-25.1, CDC-25.2 n'est pas nécessaire à la régulation des divisions intestinales avant le stade E16 (Lee et al. 2016). Elle exerce un rôle plus tardif au cours du développement intestinal et est essentielle pour les dernières divisions du lignage E, celles permettant de passer du stade E16 au stade E20 (Lee et al. 2016). Ainsi, la déplétion de CDC-25.2 entraîne un arrêt des divisions intestinales au stade E16. Les embryons *cdc-25.2* ne présentent pas d'intestin formé de vingt entérocytes (Lee et al. 2016).

#### 4) La kinase inhibitrice du cycle WEE-1.1

Le génome de *C. elegans* n'encode qu'un seul homologue de Wee1 : la protéine kinase WEE-1.1 (Wilson et al. 1999). Il s'agit d'une protéine inhibitrice du cycle. Elle agit en phosphorylant et en inhibant les protéines CDK. Le rôle de Wee1 s'oppose à celui de Cdc25 dans la régulation de la transition G2/M.

Chez *C. elegans*, la localisation et la dynamique de la protéine WEE-1.1 endogène n'ont pas encore été publiées dans la littérature. Toutefois, des expériences d'hybridation in situ montrent que les transcrits *wee-1.1* ne sont visibles que transitoirement dans les embryons 12-16-cellules, seulement dans les cellules E2 et huit descendants du blastomère AB (**fig. 36A** ; (Wilson et al. 1999)). Les cellules Ea et Ep sont les premières cellules à exprimer *wee-1.1* et celles dans lesquelles l'expression est la plus forte (Robertson et al. 2014; Wilson et al. 1999). Par ailleurs, cette forte expression au sein des cellules filles du blastomère E



est dépendante du signal intercellulaire P2 -> EMS, et notamment de la voie Wnt (Robertson et al. 2014). L'expression de *wee-1.1* au sein de Ea et Ep a une fonction au sein du lignage intestinal : WEE-1.1 permet de rallonger la durée de cycle cellulaire de Ea et Ep (Robertson et al. 2014). En effet, les embryons *wee-1.1(null)* présentent une accélération du cycle de Ea et Ep qui se divisent précocement par rapport aux embryons contrôles (**fig. 36B**). En revanche, WEE-1.1 n'est pas essentielle à la viabilité de l'embryon puisque les embryons ne présentent pas de défaut de morphogenèse et sont viables (Robertson et al. 2014). De plus, la spécification et la différenciation des entérocytes sont normales. La perte de fonction de WEE-1.1 n'a donc pas d'incidence sur le nombre de cellules intestinales.

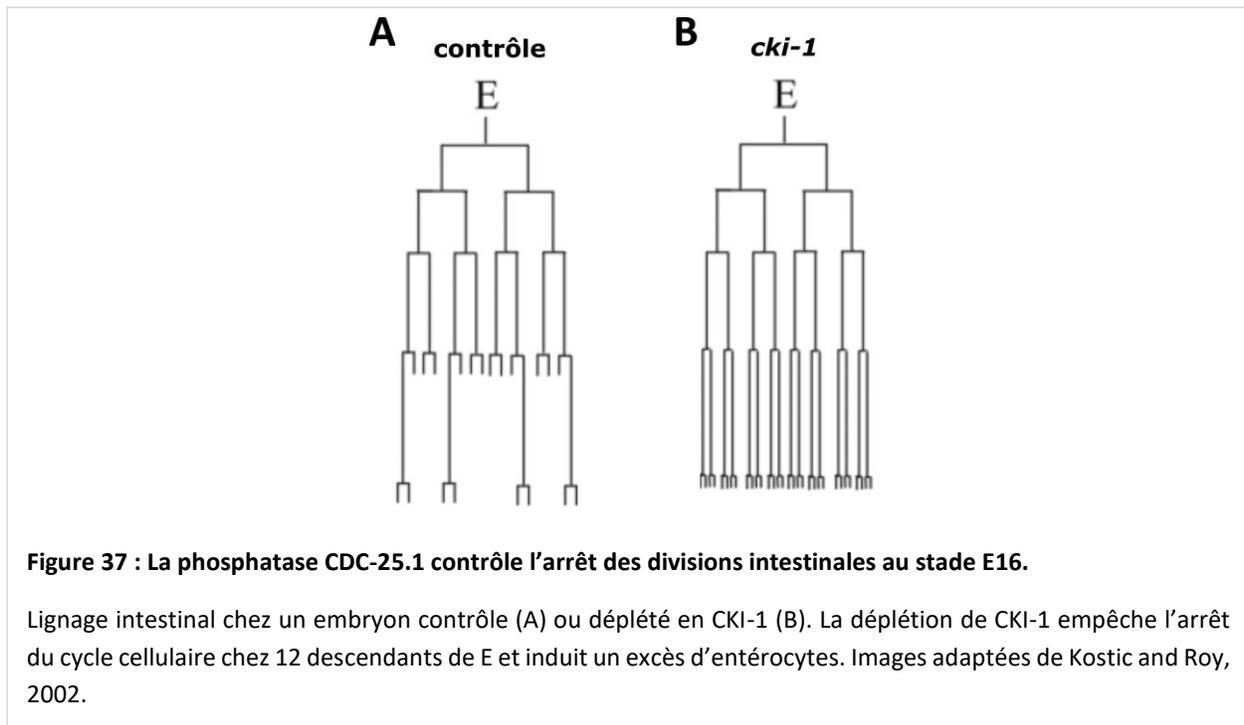
### 5) L'inhibiteur de CDK CKI-1

Un autre régulateur du cycle cellulaire des descendants de E chez le nématode est CKI-1. Il s'agit d'un inhibiteur de CDK. CKI-1 est décrit en tant que régulateur de la transition G1/S (Boxem and van den Heuvel 2001). L'expression ectopique de *cki-1* a été montrée comme induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Hong, Roy, and Ambros 1998). Au contraire, la perte de fonction de CKI-1 entraîne des divisions surnuméraires dans de nombreux lignages cellulaires (Feng et al. 1999; Fukuyama et al. 2003; Hong et al. 1998). L'absence de CKI-1 induit une entrée précoce des cellules en phase S.

En particulier, l'absence de CKI-1 entraîne une division supplémentaire des descendants de E. Contrairement à ce qui est observé dans les mutants gain de fonction *cdc-25.1*, l'absence de CKI-1 n'accélère pas les divisions du lignage E (Kostić and Roy 2002). La division supplémentaire est une division tardive concernant les cellules qui, normalement, arrêtent de se diviser au stade E16 (**fig. 37** ; (Kostić and Roy 2002)). Ainsi, les embryons *cki-1* présentent une hyperplasie intestinale. (**fig. 37** ; (Fukuyama et al. 2003; Kostić and Roy 2002)).

#### iv. Importance de la régulation des divisions pour la morphogénèse

La régulation des divisions intestinales est également importante pour l'organogénèse et la morphogénèse de l'intestin. En effet, un défaut de spécification intestinale engendre fréquemment une gastrulation anormale. Dans les embryons contrôles, au stade 26-cellules, la gastrulation commence par la migration des deux descendants de E, Ea et Ep, vers le centre de l'embryon depuis la surface ventrale de celui-ci (**fig. 38A** ; (J. Y. Lee et al. 2006)). Cette migration cellulaire se déroule quelques minutes avant que Ea et Ep ne se divisent. En d'autres mots, la division de Ea et Ep, marquée par l'introduction d'une phase G2, ne commence qu'une fois leur internalisation terminée. Si au contraire la division de Ea et Ep est trop rapide, ces cellules vont se diviser avant leur migration. C'est le cas des embryons *skn-1(null)* dans lesquels Ea et Ep se divisent avant leur migration vers l'intérieur de l'embryon (Bowerman et al. 1992). Une partie des descendants de E persiste à la surface ventrale de l'embryon, tandis que d'autres sont internalisés. Un défaut similaire a été observé dans les embryons *med-1(null)* dans lesquels Ea et Ep se divisent environ 10 minutes plus tôt et restent à la surface ventrale de l'embryon pendant leur division (Maduro et al. 2001). Par ailleurs, dans les embryons *end-1(null)* et *end-3(null)*, Ea et Ep se divisent également précocement avant leur migration (J. Y. Lee et al. 2006). Le phénotype de la morphogénèse de l'intestin dans ces embryons reste peu voire pas décrit dans la littérature. En plus des composants moléculaires de la voie SKN-1 -> MED-1,2 -> END-1,3, les voies de signalisation Wnt et MAPK exercent aussi une fonction dans la régulation de la gastrulation (**fig. 38A** ; (J. Y. Lee et al. 2006; Robertson et al. 2014)).



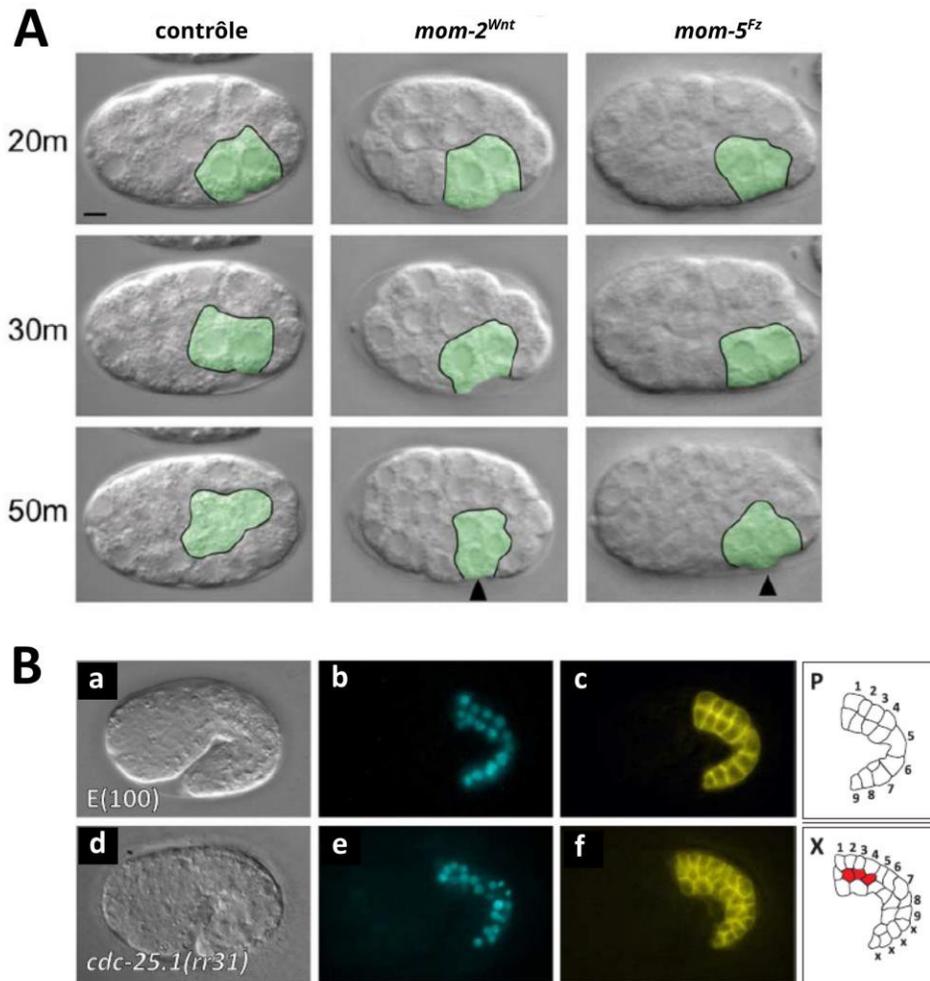
**Figure 37 : La phosphatase CDC-25.1 contrôle l'arrêt des divisions intestinales au stade E16.**

Lignage intestinal chez un embryon contrôle (A) ou déplété en CKI-1 (B). La déplétion de CKI-1 empêche l'arrêt du cycle cellulaire chez 12 descendants de E et induit un excès d'entérocytes. Images adaptées de Kostic and Roy, 2002.

En effet, la perte de fonction de MOM-2<sup>Wnt</sup>, MOM-5<sup>Frizzled</sup> ou LIT-1<sup>MAPK</sup> induit une accélération du cycle de division de Ea et Ep, qui se divisent alors avant leur migration (**fig. 38A** ; (J. Y. Lee et al. 2006; Robertson et al. 2014)). Il a été montré que la voie Wnt contrôle également la constriction apicale de Ea et Ep, en agissant sur le cytosquelette d'actomyosine (J. Y. Lee et al. 2006). En revanche, la perte de fonction de ELT-2 ne perturbe pas la gastrulation (J. Y. Lee et al. 2006), probablement dû au fait que l'expression de *elt-2* n'est détectée qu'après la migration de Ea et Ep (Fukushige et al. 1999).

Par ailleurs, en plus du rythme des divisions intestinales, l'axe de division est aussi important pour la morphogenèse de l'intestin. Dans certains embryons *end-3(null)*, Ea et Ep se divisent non seulement plus tôt que dans les embryons contrôles, mais également anormalement selon l'axe antéro-postérieur (Boeck et al. 2011). Cet axe de division atypique entraîne une organisation anormale des descendants de E au sein de l'embryon et induit ainsi une proximité anormale avec des cellules issues d'autres lignages. Par exemple, dans les embryons contrôles au stade E4, certains descendants de E en proximité avec plusieurs cellules du lignage MS reçoivent un signal Notch, essentiel pour la rotation de l'intestin visible au stade E16 (voir la partie **h.**). Si l'organisation spatiale des descendants de E est modifiée, cela peut induire *in fine* une expression ectopique de certains facteurs, notamment ceux impliqués dans la rotation de l'intestin (Boeck et al. 2011). Ce réarrangement cellulaire est critique pour la future fonction correcte de l'épithélium intestinal.

Par ailleurs, le nombre de divisions des cellules intestinales influence également la morphogenèse du tissu. Comment l'intestin s'organise-t-il dès lors qu'il est constitué de plus de vingt entérocytes ? L'organisation des cellules intestinales surnuméraires n'a été caractérisé que pour les embryons *cdc-25.1(gof)* (Choi et al. 2017). Ils présentent en moyenne 38 entérocytes. Dans les embryons contrôles, les cellules intestinales s'agencent en neuf anneaux, chacun constitué par deux entérocytes, excepté le plus antérieur composé de quatre cellules. Dans les embryons *cdc-25.1(gof)*, les cellules intestinales s'organisent en formant des anneaux supplémentaires et/ou en constituant des anneaux formés par davantage d'entérocytes (Choi et al. 2017) (**fig. 38B**). Toutefois, même si l'épithélium intestinal semble relativement correct malgré cette organisation, la polarité apico-basale intestinale, la formation de microvillosités et la morphologie de la lumière intestinale n'ont pas été décrites dans ces embryons mutants.



**Figure 38 : Le contrôle des divisions intestinales est important pour la morphogénèse.**

**(A)** Images en DIC extraites de films d'embryons contrôles ou déplétés en MOM-2 ou MOM-5. Les descendants de E sont entourés en vert. Les protéines MOM-2 et MOM-5 sont requises pour la gastrulation des cellules E2. Images adaptées de Lee *et al.*, 2006. **(B)** Images d'un embryon contrôle (a-c) ou *cdc-25.1(gof)* (d-f) exprimant un marqueur nucléaire intestinal (*elt-2::mCherry::H2B*) (bleu) et un marqueur membranaire intestinal (*end-1::CAAX::GFP*) (jaune). Schémas représentant l'organisation des entérocytes sur la base du marqueur membranaire des images à côté. Les entérocytes surnuméraires s'organisent en anneaux de plus de cellules (rouge) ou en anneaux supplémentaires (x). Images adaptées de Choi *et al.*, 2017.

## e. Résumé des phénotypes induisant un excès d'entérocytes chez le nématode

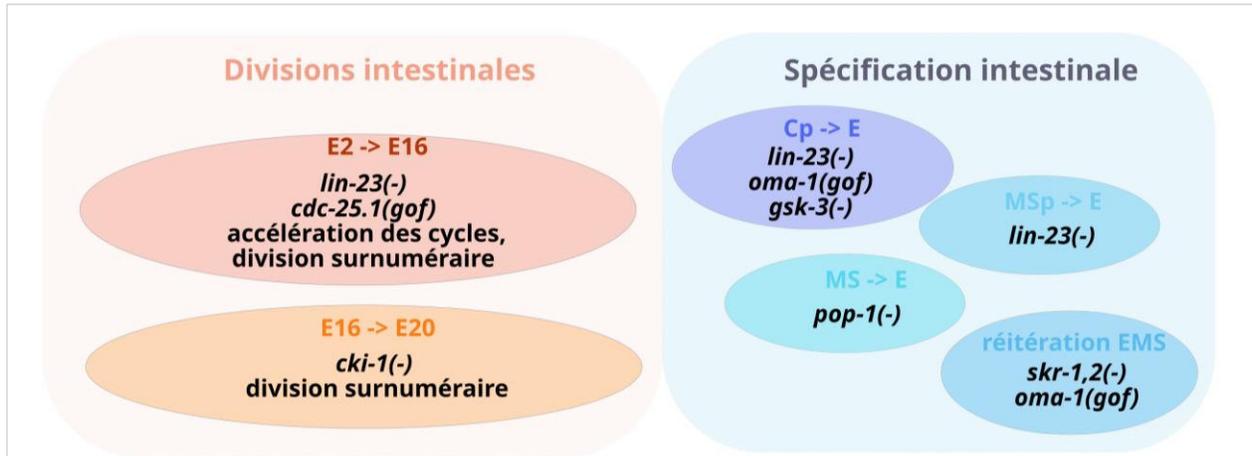


Figure 39 : Résumé des phénotypes induisant un excès d'entérocytes.

L'excès d'entérocytes peut provenir d'un défaut du nombre et/ou de la vitesse des divisions intestinales. La déplétion de LIN-23 et le gain de fonction de CDC-25.1 induisent une accélération des cycles intestinaux de E2 à E16. La déplétion de CKI-1 empêche l'arrêt du cycle dans 12 des 16 cellules intestinales, et induit ainsi une division surnuméraire. L'excès d'entérocytes peut également être dû à un défaut de spécification intestinale. La cellule Cp adopte le devenir du blastomère E lors de la déplétion de LIN-23 ou GSK-3 ou lors du gain de fonction de OMA-1. Les descendants de MSp adoptent le destin cellulaire de E lors de la déplétion de LIN-23. Le blastomère MS adopte le devenir de sa cellule sœur, E, lors de la déplétion de POP-1. Une réitération du blastomère EMS se produit au sein de la cellule MS lors de la déplétion de SKR-1,2 ou suite au gain de fonction de OMA-1.

## f. Etablissement de la polarité apico-basale intestinale

### i. Etapes de la polarisation intestinale

Chez *C. elegans*, les cellules intestinales sont polarisées selon leur axe apico-basal. Le module PAR-3/PAR-6/PKC-3 est localisé au pôle apical tandis que le déterminant de polarité LET-413<sup>Scribble</sup> est situé le long de la membrane basolatérale (Achilleos et al. 2010; Legouis et al. 2000). Ces deux domaines subcellulaires sont délimités par les jonctions apicales, nommées CeAJ, constituées par le complexe cadhérine-caténine ainsi que le complexe DLG-1/AJM-1. Le pôle apical des entérocytes est spécialisé dans l'absorption des nutriments et est donc très structuré. Dans ce but, les entérocytes développent des microvillosités, formés d'ACT-5<sup>actine</sup>, à leur membrane apicale qui élaborent ensemble la bordure en brosse intestinale. Différentes protéines interagissent avec l'actine au sein des microvillosités, telles que ERM-1<sup>ezrine</sup> ou EPS-8. Par ailleurs, les filaments d'actine microvillositaire viennent s'ancrer au sein d'un réseau

terminal sous-jacent à la bordure en brosse. Ce réseau de filaments intermédiaires, nommé endotube, compose également le réseau terminal. En outre, les noyaux des cellules intestinales sont localisés de manière basale dans l'intestin polarisé.

Les cellules intestinales se polarisent au cours du stade E16. L'intestin en devenir est alors constitué de 10 cellules situées dorsalement et de 6 cellules localisées ventralement (Leung et al. 1999). Ces cellules sont organisées de manière symétrique selon l'axe gauche-droite. Les cellules intestinales subissent une polarisation dit « cytoplasmique » (Leung et al. 1999). Dans les stades précédents le stade E16, chaque descendant de E possède un noyau localisé de manière centrale au sein de la cellule. Au cours de la polarisation cytoplasmique, les noyaux des cellules intestinales migrent vers le futur pôle apical (**fig. 40A** ; (Leung et al. 1999)). Environ 30 minutes depuis le début du stade E16, les noyaux des cellules situées à gauche de l'intestin migrent vers la droite et à l'inverse, les noyaux des cellules situées à droite migrant vers la gauche (Leung et al. 1999). Ces mouvements nucléaires créent des paires de noyaux regroupés près du futur pôle apical des entérocytes. Comme l'intestin au stade E16 est symétrique, il est possible de tracer une ligne imaginaire au centre de l'intestin le long de l'axe antéro-postérieur et divisant l'axe gauche-droite : elle est nommée « ligne médiane » (Leung et al. 1999). Cette ligne médiane correspond aux contacts homotypiques entre les cellules intestinales à la position la plus interne de l'embryon. Elle deviendra la membrane apicale des entérocytes après leur polarisation. L'intestin en devenir adopte une symétrie radiale par rapport à cette ligne médiane. La polarisation cytoplasmique provoque également l'apparition d'une zone subcellulaire au niveau de la ligne médiane sans organelles (Leung et al. 1999). En parallèle, les entérocytes changent de forme : ils s'allongent le long de l'axe gauche-droite de l'embryon associé à un raccourcissement de l'intestin en devenir selon l'axe antéro-postérieur (Leung et al. 1999).

Dans le même temps que la polarisation cytoplasmique, les entérocytes subissent également une polarisation épithéliale au cours de laquelle les pôles apico-basaux cellulaires vont s'établir (Achilleos et al., 2010; Feldman and Priess, 2012; Leung et al., 1999; Pickett M. et al., 2021). Dans un premier temps, les protéines qui seront liées à la surface apicale se concentrent localement et forment des agrégats protéiques le long des membranes latérales des entérocytes (**fig. 40A** ; (Achilleos et al., 2010; Feldman and Priess, 2012; Pickett Melissa et al., 2021)). Ces agrégats contiennent les déterminants de polarité apicale PAR-3/PAR-6/PKC-3 et les protéines jonctionnelles du complexe cadhérine-caténine (HMR-1, HMP-1 ou HMP-2). Des protéines liées à l'extrémité (-) des microtubules  $\gamma$  sont également enrichies (**fig. 40A** ; (Feldman and Priess 2012; Sallee et al. 2018)). Par ailleurs, ces agrégats sont associés avec une « plume » émanant du centrosome et contenant des nucléateurs de microtubules telles que la  $\gamma$ -tubuline et CeGrip-

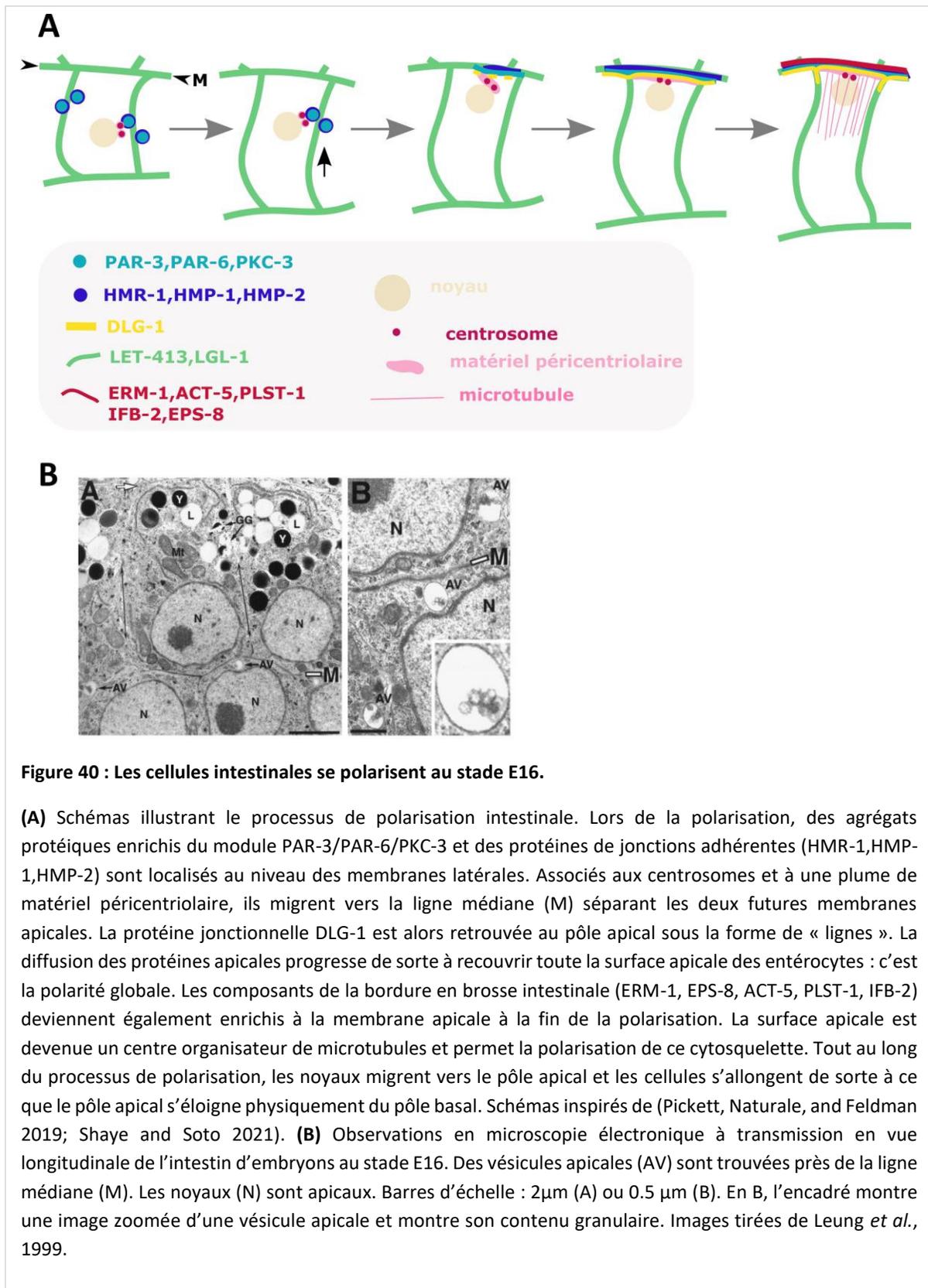
1 (Feldman and Priess 2012; Sanchez et al. 2021). Ensuite, ces agrégats latéraux ainsi que la « plume » et le centrosome migrent ensemble vers la ligne médiane intestinale, au niveau de laquelle ils se diffusent à la surface apicale de chaque entérocyte (**fig. 40A**). Cette étape de polarisation a été récemment nommée « polarité locale » (Pickett M. et al., 2021). La migration des agrégats protéiques se déroule en même temps que la migration des noyaux intestinaux. A ce stade, l'enrichissement apical partiel des protéines de polarité, de jonctions adhérentes et de microtubules est observé sous la forme de « lignes » discontinues. Lorsque ces protéines se sont diffusées sur tout le pôle apical, une surface apicale continue le long de la ligne médiane intestinale a été générée, établissant ainsi la polarité apicale des entérocytes au début du stade lima bean. Il s'agit alors de la « polarité globale » (Pickett M. et al., 2021). Les protéines HMR-1/HMP-1/HMP-2 deviennent localisées sous la membrane apicale, en subapical, au stade comma. Ce processus de polarisation épithéliale dure environ une heure (Pickett M. et al., 2021). La présence de nucléateurs de microtubules à la surface apicale suggère que celle-ci représente un centre organisateur de microtubules. Les entérocytes développent ainsi une polarité des microtubules, nucléés depuis le pôle apical vers le pôle basal, avec la présence d'un centre organisateur des microtubules apical (**fig. 40A**).

Au contraire des protéines du complexe cadhérine-caténine, le complexe DLG-1/AJM-1 se polarise sans être colocalisé avec le module PAR au sein des agrégats latéraux (Pickett M. et al., 2021). Des points subapicaux enrichis en DLG-1 apparaissent et ne sont pas colocalisés avec PAR-3. Par la suite, DLG-1 forme des bandes subapicales fragmentées (**fig. 40A**). Elles sont adjacentes à la surface apicale et plus basales que HMR-1. Ces bandes s'assembleront *in fine* pour former le motif d'échelle caractéristiques des jonctions apicales dans l'intestin du nématode (Pickett M. et al., 2021).

Par ailleurs, certains composants de la bordure en brosse tels que ERM-1, ACT-5, PLST-1 et IFB-2 s'enrichissent également au pôle apical durant le stade E16 ou au début du stade lima bean (**fig. 39A** ; (Bidaud-Meynard et al. 2021)). Le régulateur des filaments intermédiaires IFO-1 s'accumule à la membrane plasmique apicale avant même la localisation de IFB-2 (Carberry et al. 2012). Toutefois, la description fine des étapes précoces de la polarisation de ces facteurs n'a pas encore été effectuée.

En MET, des vésicules ont été détectées au stade E16 (**fig. 40B** ; (Leung et al. 1999)). Localisées au niveau de la ligne médiane, il s'agit des seuls organelles cytoplasmiques visible dans cette région subcellulaire. Puisqu'elles sont localisées proches de la future membrane apicale des entérocytes, elles sont appelées « vésicules apicales ». Il n'est pas connu actuellement si ces vésicules apicales correspondent aux agrégats protéiques observés aux premières étapes de la polarisation.

Si la polarisation des protéines apicales est bien caractérisée, le processus de polarisation des protéines exprimées à l'autre pôle cellulaire est moins connu. Les protéines basolatérales, telles que LET-413<sup>Scribble</sup> et LGL-1<sup>Lgl</sup> se localisent tout d'abord le long de toutes les membranes plasmiques des entérocytes, y compris la membrane apicale (**fig. 40A** ; (Pickett M. et al., 2021)). Elles ne s'associent pas spécifiquement aux agrégats protéiques latéraux. LGL-1 et LET-413 se retrouvent colocalisées avec PAR-3 au niveau de la surface apicale en formation. Au stade comma, ces protéines sont exclues du pôle apical et adoptent alors une localisation basolatérale (**fig. 40A** ; (Beatty et al., 2010; Bossinger et al., 2004; Legouis et al., 2000; Pickett M. et al., 2021)). Par ailleurs, il est connu que la protéine kinase PAR-1 se localise aux membranes basolatérales dans de nombreux épithélia. Au début de la polarisation épithéliale PAR-1 est localisée au niveau des centrosomes, ce qui est cohérent avec sa capacité à se lier aux microtubules et à s'associer aux protéines interagissant avec les protéines dans des cellules de mammifères ou dans l'épithélium folliculaire chez la drosophile (Cohen et al. 2004; Doerflinger et al. 2003). De plus, PAR-1 est également localisée faiblement au niveau des membranes plasmiques, comme LGL-1 et LET-413. Par la suite, PAR-1 perd sa localisation latérale et devient enrichie au pôle subapical, en étant séparée de PAR-3 (Pickett M. et al., 2021). PAR-1 s'organise avec une localisation très similaire aux jonctions avec un motif d'échelle et un peu plus basale que DLG-1 (**fig. 40A** ; (Pickett M. et al., 2021; Sanchez et al., 2021)). Ainsi, la localisation de PAR-1 dans les entérocytes du nématode diffère avec sa localisation décrite dans de nombreux épithélia à la membrane basolatérale.



## ii. Mécanismes régulateurs de la polarisation intestinale

Quels sont les mécanismes impliqués dans la régulation de la polarisation intestinale ? PAR-3 est requise pour coordonner l'établissement de la polarité des cellules intestinales. Elle est nécessaire pour la localisation de PKC-3 et PAR-6 à la membrane apicale (Achilleos et al., 2010; Pickett M. et al., 2021). En effet, en l'absence de PAR-3, les deux autres protéines du module PAR ne sont pas polarisées et restent uniformément dans les entérocytes. De plus, PAR-3 est également requis pour les premières étapes d'enrichissement apical des protéines jonctionnelles telles que HMR-1, DLG-1 ou encore PAR-1. Au contraire de PAR-3, PAR-6 n'est pas nécessaire à la polarisation des cellules intestinales. En effet, son absence n'induit pas de défaut d'enrichissement apical de PAR-3, des jonctions (DLG-1, HMP-1) ainsi que des protéines de la bordure en brosse (IFB-2, ACT-5) (Totong, Achilleos, and Nance 2007). En revanche, l'absence de PAR-6 perturbe l'accumulation apicale de PKC-3 et est nécessaire à la compaction des jonctions (Totong et al. 2007). Par ailleurs, PAR-3 et PKC-3 ne sont pas requises pour l'exclusion de LET-413 du pôle apical des entérocytes (Pickett M. et al., 2021). Par ailleurs, le mouvement de la « plume », enrichie en nucléoteurs des microtubules, dépend également de PAR-3 (Feldman and Priess 2012). En effet, en l'absence de PAR-3, les centrosomes et le matériel péricentriolaire ne migrent pas vers la membrane apicale (Feldman and Priess 2012; Sanchez et al. 2021). Il a été décrit que PAR-3 ainsi que les microtubules sont requis pour le repositionnement des centrosomes vers le pôle apical et l'accumulation apicale de  $\gamma$ -tubuline.

Alors que PAR-3 est nécessaire pour la mise en place de la polarité intestinale, elle ne régule pas seule la polarité locale des cellules intestinales. En effet, la déplétion de PAR-3 spécifiquement dans les entérocytes perturbe la formation d'une surface apicale continue. Les composants des jonctions, des microtubules ou encore de la bordure en brosse présentent une localisation fragmentée et deviennent enrichis au pôle apical de certains entérocytes (Pickett M. et al., 2021). Cela suggère que la polarité locale ne dépend pas uniquement de PAR-3 ; elle fonctionne en parallèle avec HMR-1 dans ce processus. En effet, les embryons déplétés en PAR-3 et HMR-1 dans l'intestin ne présentent plus d'enrichissement local de protéines apicales dans les entérocytes (Pickett M. et al., 2021).

Par ailleurs, alors que Crumbs et CDC-42 sont localisées au pôle apical des entérocytes et que LGL-1 est localisée au pôle basolatéral, ces protéines ne sont pas nécessaires à l'établissement de la polarité, au positionnement des jonctions apicales ainsi qu'au maintien de la polarité (Beatty et al. 2010; Waaijers et al. 2015; Zilberman et al. 2017).

### g. Ouverture de la lumière intestinale et formation des microvillosités

Au stade lima bean, alors que l'embryon commence à s'allonger, de légers trous irréguliers apparaissent entre les cellules intestinales au niveau de la ligne médiane (Leung et al. 1999). Visibles en microscopie électronique à transmission, ces espaces correspondent à la séparation des cellules de la ligne médiane. Ensuite, ces trous vont s'agrandir pour *in fine* former la lumière intestinale centrale (**fig. 41A**). Celle-ci s'étend progressivement pour atteindre une forme elliptique dans les embryons tardifs et les larves (**fig. 41A** ; (Asan et al., 2016; Bidaud-Meynard et al., 2021)). Les mécanismes de la formation de la lumière intestinale ne sont pas encore connus. Toutefois, des vésicules apicales ont été observées avant la séparation des membranes apicales et elles apparaissent continuellement au cours de la luminogénèse (Leung et al. 1999). Plusieurs hypothèses ont été émises quant à leur origine et leur rôle. Si ces vésicules apicales sont sécrétées à partir des membranes proches de la ligne médiane, leur contenu pourrait contribuer à la séparation des membranes en perturbant l'adhésion cellulaire ou le fluide extracellulaire. Si ces vésicules proviennent de la surface par endocytose, elles pourraient fonctionner en retirant des molécules adhésives de la surface cellulaire.

Au stade 1.5-fold, des extensions membranaires ressemblant à des microvillosités sont observées en MET (**fig. 41A** ; (Bidaud-Meynard et al. 2021)). Elles commencent ensuite à recouvrir la surface apicale des entérocytes avec un motif irrégulier au stade 2.5-fold, pour *in fine* former la bordure en brosse régulière à partir du stade 3-fold (**fig. 41A** ; (Bidaud-Meynard et al. 2021)). Des mesures effectuées sur les images de MET montrent une augmentation relativement continue de la densité des microvillosités ainsi que de leur longueur et largeur (Bidaud-Meynard et al. 2021). Cela suggère une maturation graduelle de la bordure en brosse. Par ailleurs, l'augmentation progressive de la densité des microvillosités suggère une formation de microvillosités *de novo* au cours de l'embryogenèse de sorte à ce qu'elles se développent sur toute la surface apicale en expansion (**fig. 41A** ; (Bidaud-Meynard et al. 2021)). Par ailleurs, dans les larves *C. elegans*, une étude récente a mis en évidence un processus de formation de nouvelles microvillosités par division de microvillosités matures (Zhu et al. 2022). En effet, les microvillosités peuvent se diviser à partir de la pointe jusqu'à leur base ; elles adoptent alors une forme en Y (Zhu et al. 2022). La division est facilitée par les protocadhérines, telles que CDH-8, qui relie les microvillosités entre elles. Les larves mutantes *cdh-8* présentent un nombre plus important de microvillosités en forme de Y.

Les composants des microvillosités s'enrichissent à la membrane apicale au cours de la croissance et de la maturation des microvillosités (**fig. 41B** ; (Bidaud-Meynard et al. 2021), voir résultats complémentaires). Certains marqueurs (PLST-1, ACT-5, ERM-1, FLN-2, IFB-2) sont déjà enrichis au pôle

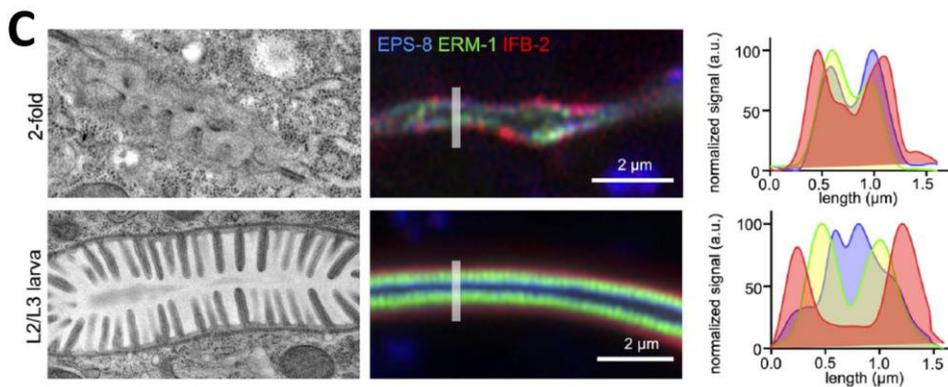
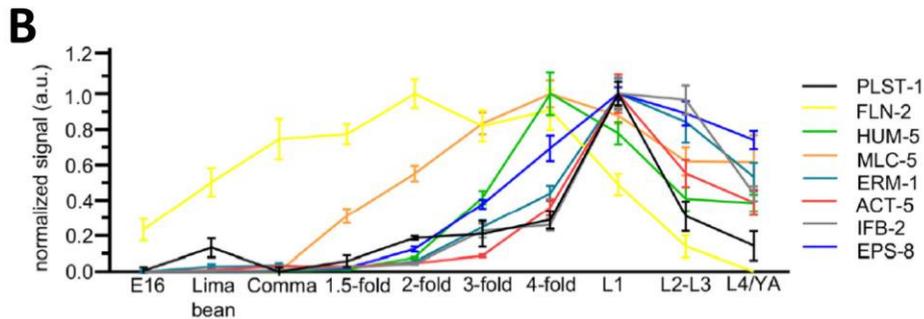
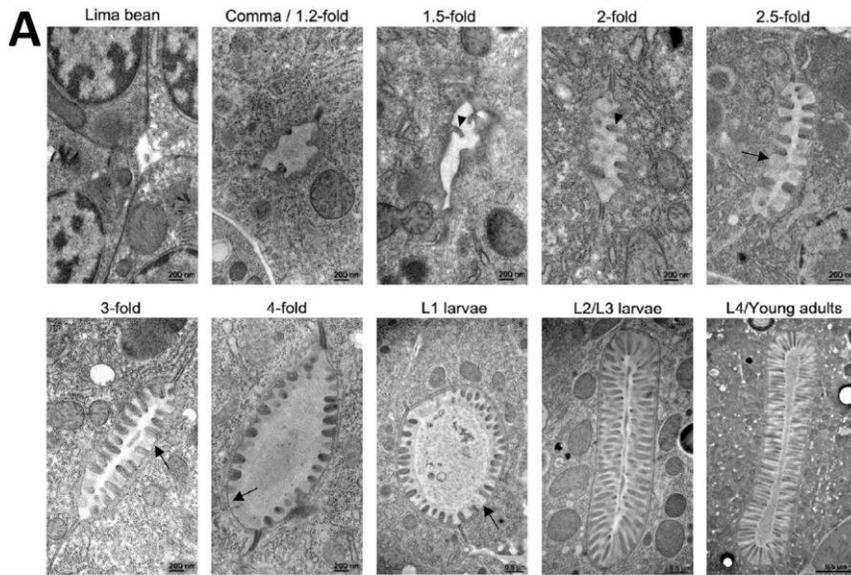
apical des entérocytes au stade lima bean, avant la formation des microvillosités. La localisation apicale de ces marqueurs, ainsi que celle de EPS-8, HUM-5 et MLC-5 augmente lors de la croissance des microvillosités à partir du stade 1.5-fold (Bidaud-Meynard et al. 2021). La localisation fine des composants de la bordure en brosse est précisément régulée et évolue entre la formation des microvillosités (2-fold) et les microvillosités matures et fonctionnelles (vie larvaire et adulte). Par exemple, dans l'intestin adulte, EPS-8 est située au niveau de la pointe des microvillosités, IFB-2 est localisée au niveau du réseau terminal et ERM-1 est exprimée tout le long des microvillosités (Bidaud-Meynard et al. 2021) (**fig. 41C**). La dynamique des protéines ERM-1, EPS-8, ACT-5 et IFB-2 a été décrite au cours de l'embryogenèse et à la vie larvaire et adulte (Bidaud-Meynard et al. 2021). ERM-1 et EPS-8 sont très dynamiques avant la formation des microvillosités, mais deviennent très stables dans les microvillosités en maturation ou matures (Bidaud-Meynard et al. 2021; Ramalho et al. 2020; Rimmelzwaal et al. 2021). ACT-5 adopte un comportement dynamique qui persiste après l'éclosion (Bidaud-Meynard et al. 2021). En revanche, IFB-2 présente un comportement beaucoup plus stable à chaque stade développemental (Bidaud-Meynard et al. 2021).

## **h. Mouvements cellulaires influençant l'organogenèse intestinale**

### **i. De nombreux réarrangements cellulaires forment l'intestin mature**

Chez *C. elegans*, l'épithélium intestinal doit subir de nombreux réarrangements cellulaires afin de former un intestin mature et fonctionnel. Au cours du lignage intestinal, le blastomère E se divise selon l'axe antéro-postérieur, ses cellules filles Ea et Ep se divisent selon l'axe gauche-droite et les cellules E4 se divisent selon l'axe antéro-postérieure (Asan et al. 2016). L'orientation de ces divisions cellulaires a une conséquence sur la symétrie de l'intestin en devenir. Pour simplifier la description de ces réarrangements cellulaires, Asan et ses collaborateurs ont choisi le stade E16 comme point de référence. Ils ont nommé les cellules en fonction de leur position à ce stade et se réfèrent également au stade E20 (Asan et al. 2016). Cette nomenclature est ainsi différente d'une nomenclature précédente qui se référait plutôt à l'origine des cellules qui composent chaque anneau dans l'intestin au stade E20 (Leung et al. 1999).

Asan et ses collaborateurs ont décrit finement le développement intestinal et les réarrangements cellulaires qui s'y déroulaient en filmant des embryons exprimant un marqueur membranaire spécifique des entérocytes (Asan et al. 2016). Ils ont utilisé ces films pour construire des reconstructions en 3D de la position des cellules depuis le stade E8 jusqu'au début du stade E20.



**Figure 41 : Ouverture de la lumière formation et formation des microvillosités.**

(A) Images en microscopie électronique à transmission (MET) en vue transversale montrant la lumière intestinale dans les stades développementaux indiqués. (B) Localisation apicale absolue des marqueurs indiqués normalisée selon l'expression maximale de chaque marqueur à différents stades développementaux. (C) A gauche, des images en MET montre la morphologie de la bordure en brosse intestinale dans les embryons au stade 2-fold ou dans les jeunes larves. Au milieu, des images en super-résolution montre la bordure en brosse d'embryons ou de larves qui coexpriment EPS-8::BFP (bleu), ERM-1::mNG (vert) et IFB-2::wSc (rouge). A droite, les histogrammes correspondant au profil d'intensité de signal de ces trois marqueurs le long de la ligne grise dessinée sur les images de fluorescence. Images tirées de Bidaud-Meynard *et al.*, 2021.

Au stade E8, l'épithélium intestinal est relativement planaire. Peu de temps avant les divisions entre les stades E8 et E16, les cellules de l'anneau 2/5 (futurs anneaux 2 et 5) subissent une constriction dorsale qui induit le repositionnement ventral de ces cellules (**fig. 42** ; (Asan et al. 2016)). Dans le même temps, les cellules flanquant l'int2/5 migrent l'une vers l'autre pour fermer ensemble cette rangée de cellules désormais située ventralement. Lorsque les cellules E8 se divisent pour former l'intestin au stade E16, les cellules filles de l'int2/5 sont maintenues ventralement, comme leurs mères. Des données suggèrent que ce repositionnement ventral des cellules E8 résulte de forces générées au sein même de l'intestin (Asan et al. 2016). Toutefois, les mécanismes ne sont pas encore connus. Par ailleurs, il n'est pas décrit si le repositionnement ventral est essentiel pour former la forme finale tubulaire de l'intestin. Cependant, ce réarrangement cellulaire permet d'étendre la surface antérieure de l'intestin E16 de sorte à ce qu'il couvre entièrement la surface postérieure de la valve pharyngo-intestinale et du pharynx (Asan et al. 2016). Cette extension de surface dans l'axe dorso-ventrale et l'amplification de la surface de contact est nécessaire à la bonne polarisation des cellules du pharynx et de la valve (Asan et al. 2016). Par ailleurs, l'int8 se situe également ventralement.

Alors que l'intestin au stade E16 est constitué de deux couches cellulaires distinctes, l'intestin mature est formé par une seule couche de cellules épithéliales. Pour se faire, des cellules intestinales spécifiques s'intercalent de manière orthogonale à l'axe central, de sorte à ce que toutes les cellules s'alignent *in fine* en deux rangées longitudinales (Asan et al. 2016; Leung et al. 1999). Alors que les entérocytes ont terminé leur polarisation, les cellules de l'int5, puis celles de l'int2, s'intercalent et se réalignent au sein d'un axe commun avec les autres cellules E16 (**fig. 42** ; (Asan et al. 2016)). Le processus d'intercalation est invariant : les cellules de l'int5 s'intercalent entre les anneaux int4 et int6 tandis que les cellules de l'int2 s'intercalent entre les anneaux int1 et int3 (Asan et al. 2016). L'intercalation cellulaire est médiée par l'extension de la membrane apicale des cellules qui produit de fines protrusions latérales. L'intercalation de l'int2 se produit alors que l'intestin et le corps de l'embryon commencent à s'allonger (Asan et al. 2016).

Après que les cellules intestinales ont terminé leur intercalation, certains anneaux intestinaux subissent des rotations au cours du développement du tissu. Ainsi, les anneaux int2 à int4 subissent une rotation dans le sens des aiguilles d'une montre (**fig. 42** ; (Asan et al. 2016)). Plus tard, les anneaux int7 à int9 subissent également une rotation dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (Asan et al. 2016). Ces événements plus tardifs n'ont pas été caractérisés finement puisqu'ils se déroulent alors que l'embryon bouge au sein de sa coquille, à partir du stade 2-fold. En effet, à ce stade, les contractions

musculaires s'activent pour contribuer à l'élongation de l'embryon. A cause de ces mouvements, il est impossible de filmer le développement intestinal à partir du stade 2-fold et jusque l'éclosion.

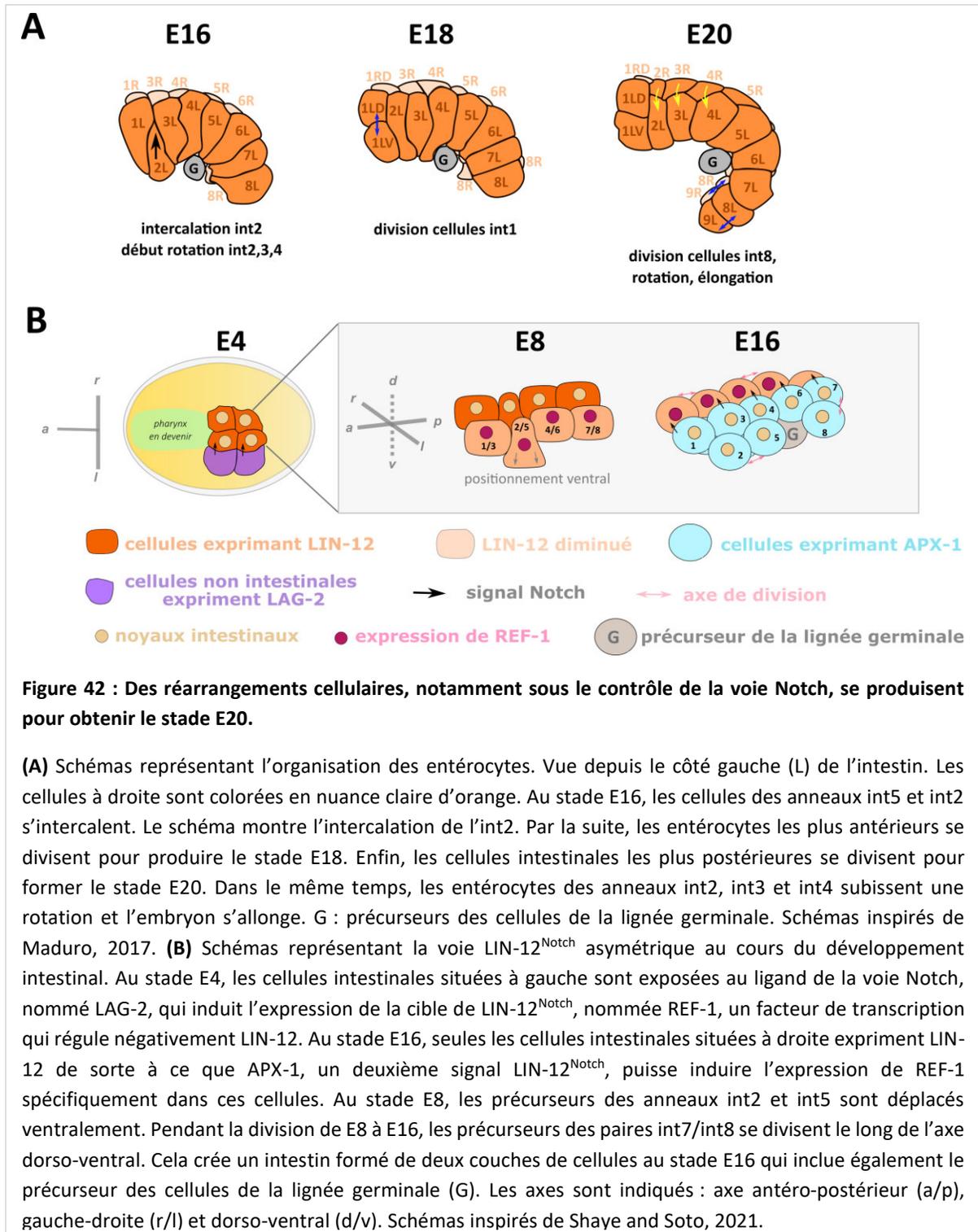
## ii. Régulation de ces mouvements cellulaires

Au stade E8, l'intestin est relativement planaire. Cet alignement est maintenu par VANG-1, le seul homologue de Strabismus/Van Gogh chez le nématode, un composant la voie de polarité planaire cellulaire (**fig. 42** ; (Hoffmann et al. 2010)). Les embryons *vang-1(null)* présentent un intestin au stade E8 non-planaire (Asan et al. 2016). Par la suite, ces embryons mutants développent un intestin E16 anormal, avec des défauts de l'organisation des anneaux intestinaux.

La voie de signalisation LIN-12<sup>Notch</sup> exerce un rôle essentiel au cours de ces réarrangements cellulaires (**fig. 42**). Tout d'abord, elle génère l'asymétrie gauche-droite observée aux stades E4 et E8. Au stade E4, les cellules intestinales expriment le récepteur LIN-12. Toutefois, seules les cellules du côté gauche de l'intestin en devenir contactent des cellules situées en-dehors de l'intestin qui expriment le ligand LAG-2<sup>Delta</sup> (Asan et al. 2016). LAG-2 est exprimé par des descendants du lignage MSa. Cette interaction entre deux types cellulaires est requise pour induire l'organisation asymétrique et uniforme des entérocytes. Ainsi, des cellules non intestinales sont impliquées dans la régulation de l'asymétrie de l'intestin en devenir. Par ailleurs, au stade E8, l'interaction LIN-12/LAG-2 entraîne l'expression de *ref-1*, un gène cible de la voie Notch (Neves and Priess 2005). Ceci inhibe LIN-12 dans les cellules de gauche, pour permettre ensuite à la signalisation LIN-12 d'affecter seulement les cellules de droite au stade E16 (**fig. 42** ; (Asan et al. 2016; Neves, English, and Priess 2007; Shaye and Soto 2021)).

La voie LIN-12 exerce également un rôle plus tardif dans un autre type de réarrangement cellulaire. En effet, elle régule les rotations des anneaux intestinaux int2-4, en fonctionnant avec la voie de signalisation UNC-5<sup>netrin</sup> (Asan et al. 2016; Hermann, Leung, and Priess 2000). En effet, la déplétion de LIN-12 entraîne des défauts de rotations des anneaux intestinaux. Par ailleurs, cela induit également une position aberrante de la gonade par rapport l'intestin dans les larves et les adultes. Cette observation suggère que la rotation de l'intestin contribue à la morphogenèse de la gonade (Hermann et al. 2000). Par ailleurs, alors que les cellules de droite de l'intestin au stade E16 expriment LIN-12, les cellules de gauche expriment APX-1 qui est une protéine homologue du ligand Delta (**fig. 42** ; pour revue : (Shaye and Soto 2021)). APX-1 est aussi requise pour la rotation de l'intestin (Asan et al. 2016; Hermann et al. 2000; Neves et al. 2007). Alors que *ref-1* était exprimé dans les cellules de gauche de l'intestin au stade E8, il s'exprime

dans les cellules de droite dans l'intestin au stade E16, en réponse à l'interaction LIN-12/APX-1 (Hermann et al. 2000; Neves et al. 2007). Ces interactions intercellulaires impliquant la voie Notch sont essentielles pour les rotations antérieures de l'intestin. Par ailleurs, la voie Wnt associée à POP-1 permet de définir les frontières de la rotation de l'intestin (Hermann et al. 2000). Asan et ses collaborateurs proposent que la rotation des anneaux int2-int4 est importante pour aligner la lumière intestinale entre les anneaux int1 et int2 (Asan et al. 2016).

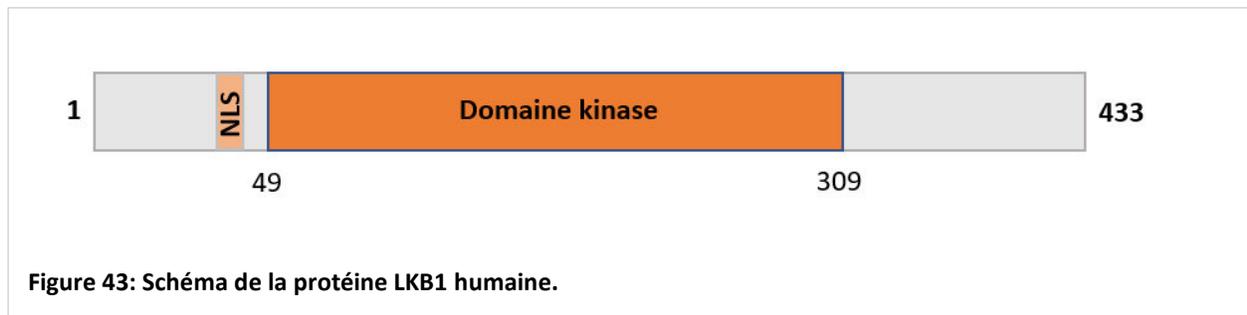


## IV. Rôles des protéines kinases LKB1 et PAR-4

Ma thèse est focalisée sur le décryptage du rôle de PAR-4 dans l'intestin de *C. elegans*. PAR-4 est l'homologue de LKB1 chez le nématode. Les parties suivantes détailleront certains rôles décrits pour les protéines PAR-4/LKB1 ainsi que leurs homologues chez la souris, le xénope ou encore la drosophile. Je me focaliserai sur certaines fonctions pertinentes pour mon projet de recherche et n'établirai donc pas de liste exhaustive de leurs nombreux rôles décrits dans la littérature.

### 1. *Lkb1* fonctionne au sein d'un complexe protéique

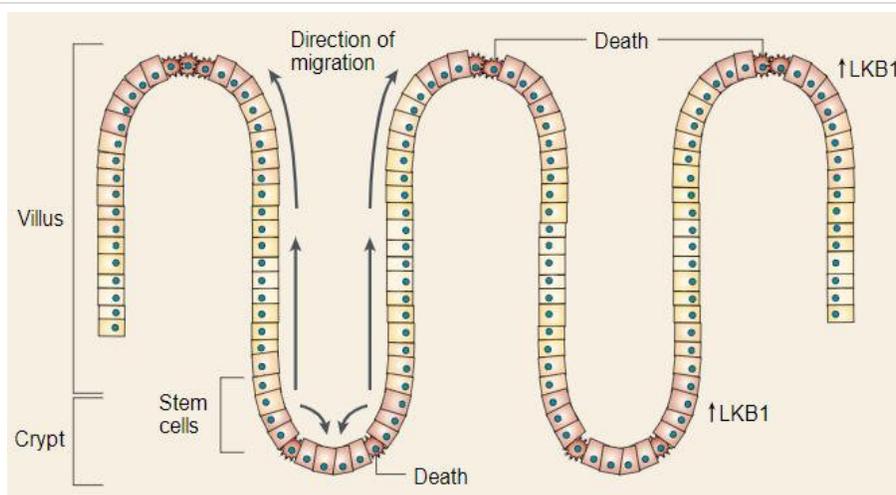
Chez l'être humain, avec son locus situé sur le chromosome 19p, le gène *lkb1* code pour une protéine qui comporte 433 acides aminés. Il s'agit d'une protéine sérine/thréonine kinase (Hemminki et al. 1998). Son domaine catalytique avec une activité kinase s'étend des résidus 49 à 309 (fig. 42). A l'origine, la protéine LKB1 a été identifiée dans le foie fœtal humain, d'où son appellation « LKB1 » pour « liver kinase B1 ». En parallèle, d'autres chercheurs ont mis en évidence cette même protéine et l'ont nommé STK11 (sérine/thréonine-protein kinase 11) (Jenne et al. 1998). Des analyses de comparaison de séquences ont montré que le domaine kinase de la protéine PAR-4 du nématode présente une homologie avec *Lkb1* chez *Drosophila melanogaster* (44% d'identité, (Martin and St Johnston 2003)), XEEK1 chez le xénope, LKB1 chez l'être humain et LKB1 chez la souris (42% d'identité pour chacune des protéines, (Watts et al. 2000)).



Chez l'être humain et la souris, le gène *lkb1* est exprimé à différents niveaux dans de nombreux tissus fœtaux et adultes (foie, sein, ovaires, poumons, colon, intestin grêle, placenta...) (Hemminki et al. 1998; Rowan et al. 2000). Les transcrits *lkb1* ont aussi été détectés dans les testicules chez l'être humain (Rowan et al. 2000). Le pancréas, le foie et le muscle squelettique présentent des niveaux élevés de LKB1. Toutefois, les niveaux d'expression de *lkb1* sont globalement plus élevés dans le fœtus que chez les

adultes, avec des niveaux fœtaux particulièrement élevés dans l'intestin grêle et l'estomac (Rowan et al. 2000). Ce motif d'expression suggère un rôle de LKB1 dans le développement fœtal et le maintien du tractus gastrointestinal.

LKB1 est exprimée dans l'épithélium intestinal chez l'être humain et la souris (Karuman et al. 2001). Comment est-elle localisée dans ce tissu ? L'épithélium intestinal est un tissu qui adopte une structure très organisée avec les cellules souches localisées au niveau des cryptes ; celles-ci donnent naissance à l'ensemble des cellules intestinales qui migrent vers la pointe des villosités (Potten 1998). Ainsi, la position d'une cellule épithéliale le long de la villosité indique son âge et son état de différenciation. Les cellules apoptotiques sont trouvées principalement au niveau des cryptes mais aussi à la pointe des villosités où les cellules épithéliales meurent lors de l'auto-renouvellement cellulaire et sont évacuées dans la lumière intestinale. Par exemple, la durée de vie moyenne d'un entérocyte est de quelques jours (pour revue : (Beumer and Clevers 2021)). Des expériences d'immunomarquage de LKB1 ont révélé une localisation différentielle au sein de l'épithélium intestinal (Karuman et al. 2001). LKB1 est localisée en fonction d'un gradient bimodal avec une expression élevée au sein des noyaux des cryptes et du cytoplasme des plus anciennes cellules épithéliales à la pointe des villosités (**fig. 44**). Son expression est



**Figure 44 : Expression de LKB1 dans l'intestin grêle.**

Les cellules souches intestinales se divisent au niveau des cryptes. Leurs descendants se différencient à mesure qu'ils migrent vers les villosités sur une période de 3 à 5 jours. Une sous-population de cellules intestinales, notamment les cellules de Paneth, migrent vers la base de la crypte. Près de la pointe des villosités, les cellules s'extrudent dans la lumière intestinale ou subissent une apoptose. Des cellules apoptotiques sont également trouvées dans les cryptes. LKB1 est détectée dans les cellules au niveau des cryptes ainsi que dans les cellules épithéliales près de la pointe des villosités, avec un niveau d'expression élevé dans les cellules qui meurent. Sur le schéma, les nuances de couleur les plus sombres correspondent aux niveaux élevés de LKB1. Schéma tiré de (Yoo et al. 2002).

la plus élevée au niveau des cellules intestinales en apoptose, suggérant un rôle dans ce processus (Karuman et al. 2001).

Dans les cellules de mammifères, de nombreuses études démontrent que la protéine LKB1 peut être localisée dans le noyau ou le cytoplasme. En effet, la protéine LKB1 possède une séquence de localisation nucléaire (NLS) au niveau de la région non-catalytique N-terminale (résidus 38-42 ; **fig. 43**). Le NLS est reconnu par l'importine- $\alpha$  qui induit la translocation nucléaire de LKB1 (pour revues : (Alessi, Sakamoto, and Bayascas 2006; Jansen et al. 2009). La localisation de LKB1 a été décrite dans de nombreuses études utilisant des systèmes de surexpression dans des cellules de mammifère. Lorsqu'elle est surexprimée dans les cellules de mammifère, sa localisation est principalement nucléaire, avec une faible fraction au sein du cytoplasme. La mutation du signal de localisation nucléaire entraîne une localisation homogène de LKB1 dans les cellules. Toutefois, la protéine LKB1 mutée sur ce NLS possède toujours la capacité de supprimer la croissance cellulaire, suggérant que LKB1 cytosolique exerce un rôle important dans ses propriétés de suppresseur de tumeur (pour revue : (Jansen et al. 2009)). Des analyses d'interaction protéique dans les cellules de mammifères ont révélé que LKB1 fonctionne au sein d'un complexe tripartite avec deux autres protéines : la pseudokinase STRAD $\alpha$  (STED20- related adaptor alpha) et la protéine MO25 (mouse protein 25). La pseudokinase STRAD $\alpha$  ne s'autophosphoryle pas et n'est pas capable de phosphoryler des substrats à cause des nombreuses mutations inactivatrices qu'elle porte dans son domaine catalytique (Baas et al. 2003; Jansen et al. 2009). L'interaction de LKB1 avec STRAD $\alpha$  et MO25 augmente son exportation hors du noyau. STRAD $\alpha$  transporte LKB1 jusque dans le cytoplasme en se liant aux facteurs d'exportations tels que CRM1 ou Exportin7. Ainsi, STRAD $\alpha$  maintient LKB1 dans le cytoplasme en établissant une compétition avec l'importine- $\alpha$  pour la liaison du NLS de LKB1 (Dorfman and Macara 2008). De plus, STRAD $\alpha$  et MO25 augmentent drastiquement l'activité kinase de LKB1 (Baas et al. 2003; Boudeau et al. 2003). A l'inverse, en absence de ces deux protéines partenaires, l'activité kinase de LKB1 est extrêmement réduite (Hawley et al. 2003). La cristallisation de la structure du complexe tripartite LKB1/STRAD $\alpha$ /MO25 a révélé des données supplémentaires sur la formation de celui-ci (Milburn et al. 2004; Zeqiraj et al. 2009). STRAD $\alpha$  lie LKB1 en tant que pseudokinase et médie sa conversion en conformation active tandis que MO25 est requise pour stabiliser la conformation active de la boucle d'activation de LKB1. Toutefois, aucune donnée structurale n'est connue actuellement concernant les domaines N et C-terminaux de la protéine LKB1.

Le substrat principal de LKB1 est la protéine AMPK (AMP-activated protein kinase). Il s'agit du régulateur majeur du métabolisme énergétique cellulaire avec des dizaines de cibles en aval. Cette

protéine contribue au maintien de la balance énergétique intracellulaire. AMPK est activée par n'importe quel stress cellulaire entraînant la déplétion de l'ATP dans la cellule (pour revue : (Jansen et al. 2009). Des études *in vitro* ont montré que LKB1 est capable de phosphoryler directement AMPK au niveau de sa boucle régulatrice. En présence de ses interacteurs STRADA et MO25, la capacité de LKB1 à phosphoryler AMPK est fortement augmentée (d'un facteur de 100) (pour revue : (Jansen et al. 2009). Ainsi, LKB1 exerce un rôle majeur dans la régulation du métabolisme cellulaire. Cette fonction a été démontrée dans des cellules de mammifère, chez la souris, mais aussi dans d'autres organismes modèles tels que la drosophile ou le nématode (Jansen et al., 2009; Lee et al., 2007; Narbonne and Roy, 2008; Shackelford and Shaw, 2009). Par ailleurs, LKB1 est capable de phosphoryler *in vitro* 12 autres protéines kinases de la même famille que AMPK (Lizcano et al. 2004) : elle est depuis lors considérée comme une « master kinase ». Parmi ces effecteurs, LKB1 est notamment capable de phosphoryler les protéines MARK1-4 (MAP/microtubule affinity regulating kinase), dont le membre MARK-3 est l'homologue de la protéine kinase PAR-1 chez le nématode (Lizcano et al. 2004).

## **2. Les fonctions cellulaires des protéines LKB1/PAR-4**

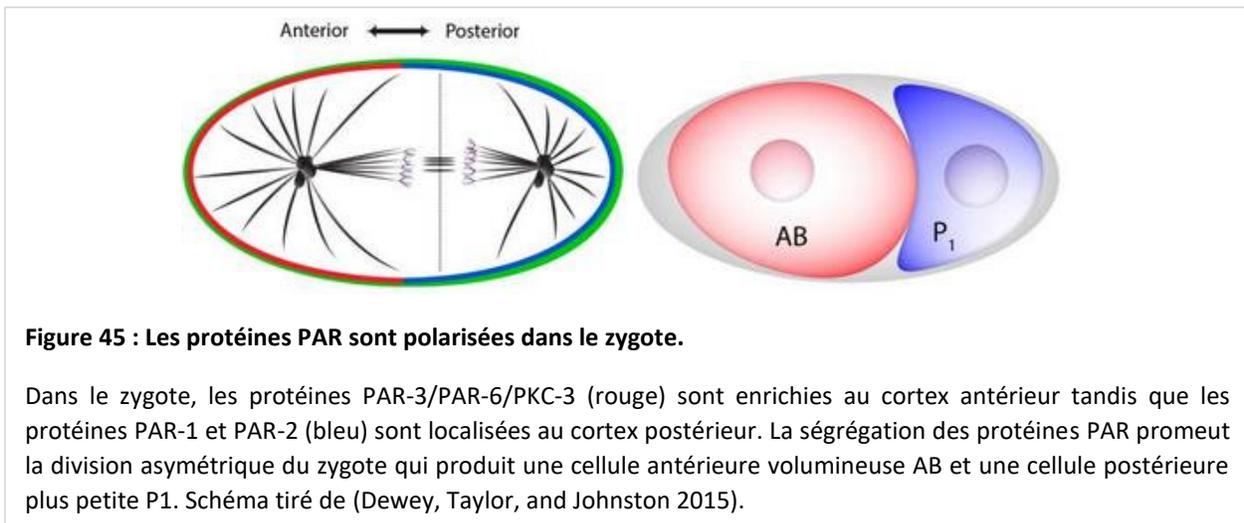
Depuis les cellules humaines jusqu'au nématode, de nombreuses études ont révélé les multiples fonctions cellulaires des protéines LKB1/PAR-4 dans des processus divers tels que le métabolisme cellulaire, la polarité, la division asymétrique, la régulation du cycle cellulaire, de la prolifération cellulaire ou encore de l'apoptose. Je vais détailler dans les paragraphes suivants quelques-uns de ces rôles.

### **a. Polarisation cellulaire et division asymétrique**

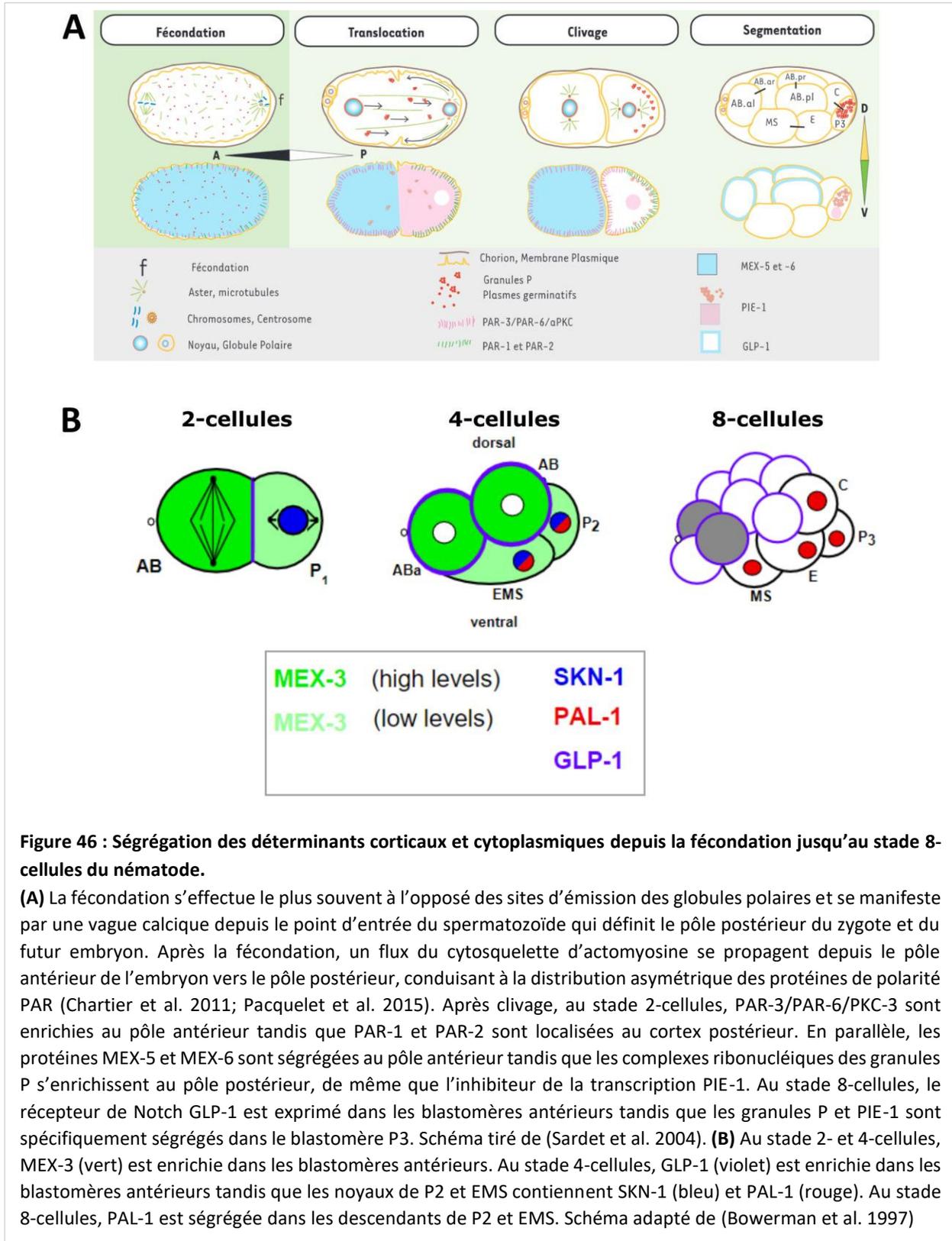
#### **i. Découverte de la protéine PAR-4 chez le nématode**

Avant de découvrir le rôle majeur de LKB1 dans la régulation du module AMPK, LKB1 était connue pour sa fonction dans la régulation de la polarisation cellulaire dans les organismes modèles. En effet, la protéine homologue à LKB1 chez *C. elegans* est la protéine kinase PAR-4. Cette dernière a été mise en évidence via des cribles génétiques effectués en 1988 par Ken Kemphues et James Priess chez le zygote du nématode (Kemphues et al. 1988). Ces cribles se focalisaient sur la recherche de mutations induisant une létalité embryonnaire précoce chez le nématode. Les embryons de *C. elegans* effectuent normalement des divisions asymétriques successives nécessaires à la viabilité embryonnaire. La première mitose de l'embryon produit deux blastomères différents : un blastomère antérieur volumineux nommé AB et un

blastomère postérieur plus petit appelé P1 (**fig. 45**). Les cribles génétiques ont révélé une famille de six gènes dont la mutation induit une létalité embryonnaire et des défauts de répartition des déterminants cytoplasmiques (Kemphues et al. 1988). Ces gènes ont été nommés *par* pour « partitioning defective ». Dans cette famille, les protéines PAR-4 et PAR-1 sont des protéines kinases sérine thréonine, PAR-5 est un membre de la famille des protéines 14-3-3, PAR-3 et PAR-6 contiennent des domaines PDZ suggérant qu'ils jouent un rôle de protéines échafaudage et enfin, PAR-2 possède un domaine RING qui suggère une fonction dans la voie de signalisation d'ubiquitination (pour revue : (Goldstein and Macara 2007)). Alors que les autres protéines PAR sont conservées, PAR-2 est spécifique au nématode. Ces protéines PAR sont recrutées dans différents contextes de polarisation cellulaire telles que la division cellulaire asymétrique ou la migration cellulaire. Elles ont un rôle essentiel dans l'établissement de la polarité dans l'embryon précoce du nématode. Dans l'embryon une-cellule du nématode, les protéines PAR-3 et PAR-6, en complexe avec la protéine kinase PKC-3, sont localisées au cortex du pôle antérieur tandis que les protéines PAR-1 et PAR-2 sont ségréguées au cortex du pôle postérieur (**fig. 45,46A**). Cette ségrégation asymétrique est maintenue grâce à une inhibition réciproque par phosphorylation des protéines aux deux pôles cellulaires (pour revues : (Goldstein and Macara, 2007; Griffin, 2015)). Par ailleurs, les cribles génétiques chez les embryons précoces du nématode ont montré que les protéines PAR étaient également impliquées dans la ségrégation du complexe ribonucléoprotéique des granules P, normalement enrichis au pôle postérieur dans le lignage P de l'embryon (**fig. 46A**).



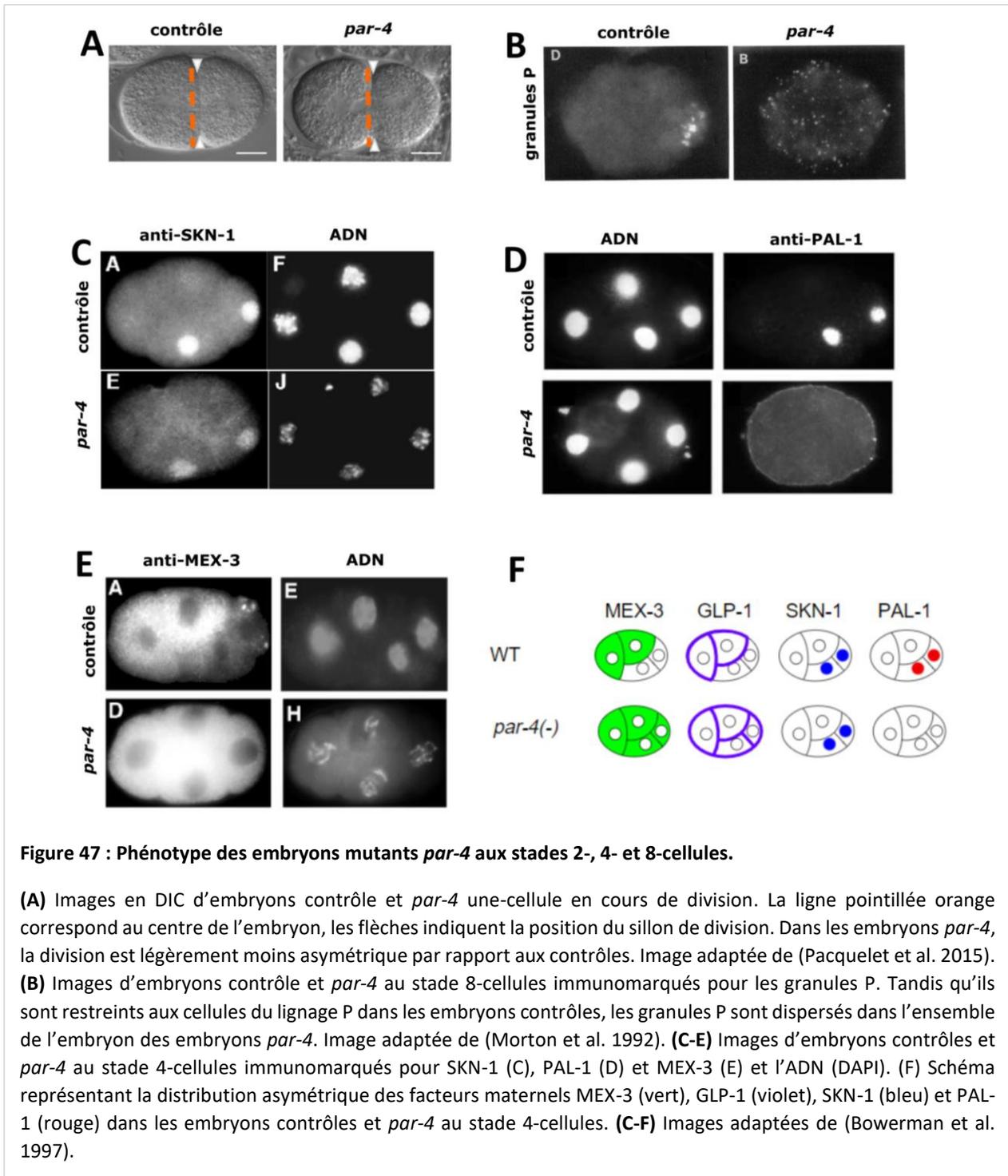
ii. Rôle de PAR-4 dans la ségrégation de facteurs dans l'embryon précoce



Au contraire des protéines PAR-1, PAR-2, PAR-3 et PAR-6, la protéine PAR-4 n'est pas localisée de manière asymétrique dans le zygote. En effet, des observations en immunofluorescence ont montré qu'elle est enrichie dans le cytoplasme avec un faible signal au cortex dans les ovocytes et les zygotes. Au stade 2- et 4-cellules, le signal PAR-4 devient plus fort au cortex, en particulier au niveau des contacts cellules-cellules, et persiste à cette localisation dans tous les blastomères le long de l'embryogenèse précoce (Watts et al. 2000). PAR-4 est également enrichie dans la gonade. Par ailleurs, la protéine PAR-4 de *C. elegans* ne possède pas de NLS, et contrairement à la protéine humaine, n'a jamais été observée dans le noyau (Watts et al. 2000).

Plusieurs mutations du gène *PAR-4* ont été décrites dans la littérature (Morton, Roos, and Kemphues 1992; Watts et al. 2000) : une mutation nulle avec l'allèle *it75*, des mutations thermosensibles dans les allèles *it47* ou *it57* ou encore des mutations faux sens pour les allèles *it33* et *it88*. Toutes ces mutations concernent le domaine kinase. Comme elles induisent un phénotype similaire à la déplétion de PAR-4 par interférence à l'ARN, ces mutations sont considérées comme des pertes de fonction (Watts et al. 2000). En particulier, la mutation thermosensible *par-4(it47)* porte une mutation ponctuelle au sein du domaine kinase près de la boucle catalytique (ATT → AGT) ce qui induit un changement d'acide aminé en position 290 de la protéine (isoleucine → sérine) (Watts et al. 2000). Au stade zygote, les embryons *PAR-4* se divisent de façon légèrement moins asymétrique que les embryons contrôles (**fig. 47A**) (Pacquelet et al. 2015). Surtout, ils présentent un défaut de ségrégation des granules P (Kemphues et al. 1988; Morton et al. 1992). Ces derniers sont normalement ségrégués spécifiquement dans le lignage P, donc dans les blastomères postérieurs nommés P1, P2, P3, correspondant aux précurseurs de la lignée germinale. Dans les embryons *PAR-4*, les granules P sont anormalement distribués de manière uniforme dans tous les blastomères embryonnaires (**fig. 47B**) (Kemphues et al. 1988; Morton et al. 1992). Dans ce cas, la lignée germinale ne peut pas se différencier normalement : les vers adultes sont alors stériles. Ainsi, PAR-4 exerce un rôle dans la ségrégation asymétrique de ces facteurs spécifiques de la lignée germinale.

En plus des granules P, la perte de fonction de PAR-4 induit également une ségrégation anormale d'autres facteurs maternels tels que SKN-1, PAL-1, MEX-5 ou GLP-1 (**fig. 47C-F**). Le facteur de transcription SKN-1 joue un rôle crucial dans la spécification intestinale, mais active également un signal Notch qui permet aux descendants de ABa de produire des cellules du pharynx (Shelton and Bowerman 1996). GLP-1 est un récepteur Notch requis dans les descendants de ABa pour répondre au signal induit par SKN-1 (Crittenden et al. 1997). PAL-1 permet la spécification du blastomère C mais aussi de la cellule E (Hunter



and Kenyon 1996; Maduro, Kasmir, et al. 2005). MEX-3 est une protéine se liant aux ARN requise pour empêcher la synthèse des transcrits *pal-1* dans les blastomères antérieurs de l'embryon précoce (Draper et al. 1996; Hunter and Kenyon 1996). Au stade 4-cellules, les cellules P2 et EMS des embryons *par-4* ont un signal SKN-1 similaire à celui des embryons contrôles (**fig. 46B, 47C**) (Bowerman, Ingram, and Hunter

1997). Toutefois, GLP-1 se retrouve localisée dans les quatre blastomères alors qu'elle n'est enrichie normalement que dans les blastomères antérieurs (**fig. 46B, 47F**) (Bowerman et al. 1997; Crittenden et al. 1997). Au même stade, la protéine PAL-1 est absente des embryons *par-4* alors qu'elle est localisée dans les quatre blastomères dans les embryons contrôles (**fig. 46B, 47D**) (Bowerman et al. 1997). De plus, dans les embryons *par-4*, MEX-3 est fortement exprimée dans le cytoplasme des quatre blastomères au stade 4-cellules alors qu'elle ne l'est normalement que dans les blastomères antérieurs ABa et ABp (**fig. 46B, 47E**) (Bowerman et al. 1997). En outre, les protéines MEX-5 et MEX-6, normalement exprimées au pôle antérieur du zygote (**fig. 46A**), deviennent uniformément localisées dans le zygote lors de la perte de fonction de PAR-4 (Tenlen et al. 2008).

Par ailleurs, il a été également décrit que les embryons *par-4* ne présentent pas de cellules intestinales différenciées (Kemphues et al. 1988; Morton et al. 1992). Dans les embryons contrôles de *C. elegans*, la présence d'entérocytes différenciés peut être mise en évidence simplement en observant la présence de granules intestinaux biréfringents. Ces granules sont absents dans les embryons mutants *par-4*. Cependant, les marqueurs de spécification intestinale tels que les facteurs END-1,3 n'ont pas été étudiés. De plus, les embryons *par-4* ne s'allongent pas (Morton et al. 1992). Ainsi, PAR-4 exerce un rôle dans la différenciation du lignage intestinal, ainsi qu'une fonction dans la ségrégation de certains facteurs maternels (GLP-1, MEX-3, PAL-1, granules P) (**fig. 47B-F**). Tous les phénotypes décrits ci-dessus ont été caractérisés suite à la perte de fonction de PAR-4 dès l'ovogenèse, affectant la contribution maternelle des différents facteurs.

Par ailleurs, PAR-4 régule également la contractilité du cytosquelette d'actomyosine au cours de la polarisation et de la cytokinèse du zygote (Chartier et al. 2011; Pacquelet et al. 2015). Dans ce processus, elle agit via la protéine kinase PIG-1, l'homologue de MELK (Maternal Embryonic Leucine zipper Kinase) chez *C. elegans* (Pacquelet et al. 2015).

### iii. Dans le nématode, PAR-4 agit ou non en complexe avec STRD-1

Chez le nématode, l'activité de PAR-4 peut nécessiter ou non une interaction avec son partenaire STRD-1, l'homologue de STRAD. La pseudokinase est enrichie au cortex cellulaire de l'embryon précoce ; PAR-4 est requise pour cette localisation tandis que STRD-1 n'est pas nécessaire à la localisation corticale de PAR-4 (Narbonne et al. 2010). En 2010, Narbonne et ses collaborateurs ont testé les fonctions de PAR-4 qui requièrent STRD-1 (Narbonne et al. 2010). Ils ont en particulier trouvé que STRD-1 est nécessaire dans

la lignée germinale pour permettre à PAR-4 de phosphoryler l'AMPK et ainsi d'induire la quiescence des cellules souches germinales (GSC) en cas de stress environnemental (Narbonne et al. 2010).

En outre, PAR-4 agit également avec STRD-1 pour réguler la division cellulaire asymétrique des neuroblastes (Chien et al. 2013). Les divisions des neuroblastes produisent deux cellules filles de taille différente et de destin cellulaire distincts : une petite cellule est destinée à mourir par apoptose tandis que la deuxième, plus large, deviendra un précurseur neuronal (Chien et al. 2013). Dans les mutants *PAR-4* et *strd-1*, les cellules filles des neuroblastes présentent une taille équivalente. Toutefois, les déterminants du devenir cellulaire sont ségrégués normalement et une des cellules filles subit bien une apoptose. Dans cette régulation, PAR-4, avec STRD-1, agit via la protéine kinase PIG-1<sup>MELK</sup> (Chien et al. 2013).

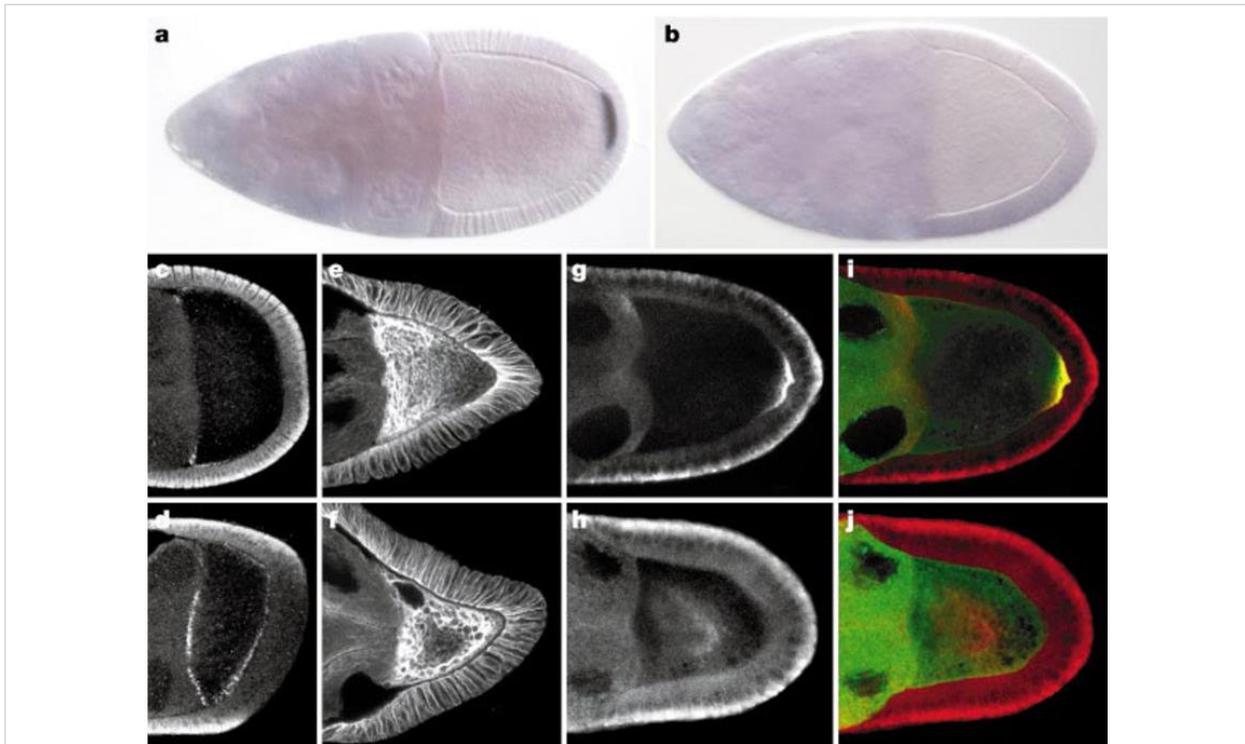
Par ailleurs, au cours du développement embryonnaire du nématode, PAR-4 exerce un rôle dans la régulation d'un processus de mort cellulaire distinct de l'apoptose caspase-dépendante (Denning, Hatch, and Robert Horvitz 2012). En effet, le lignage de *C. elegans* a montré que certaines cellules meurent de manière stéréotypée au cours du développement embryonnaire (Sulston et al. 1983). Cette mort cellulaire programmée a révélé le processus d'apoptose dépendant des caspases. Toutefois, de façon surprenante, une étude a révélé qu'une partie de ces cellules subissent un processus d'extrusion hors des épithélia (Denning et al. 2012). PAR-4 régule cette mort cellulaire en agissant en complexe tripartite avec STRD-1 et MOP-25, les homologues de STRAD et Mo25 chez le nématode. PAR-4 agit via la protéine kinase PIG-1 qui promeut le détachement cellulaire en empêchant l'expression de molécules d'adhésion cellulaire à la surface de ces cellules destinées à mourir (Denning et al. 2012).

En revanche, le bon déroulement des deux premières divisions embryonnaires, la localisation des granules P ou la phosphorylation de MEX-5 sont des processus indépendants de STRD-1. Il est intéressant de noter que l'ensemble de ces derniers processus impliquent la kinase PAR-1 dont la phosphorylation par PAR-4 est également indépendante de STRD-1 (Narbonne et al. 2010). L'ensemble de ces observations suggèrent que STRD-1 pourrait être requise pour les fonctions de PAR-4 impliquant la régulation de AMPK ou PIG-1 mais pas pour celles impliquant PAR-1.

#### iv. Fonctions de PAR-4/LKB1 dans des contextes différents de *C. elegans*

##### 1) Chez la drosophile

Chez la drosophile, de nombreuses études ont caractérisé des fonctions de LKB1 dans la régulation de la polarité et de la division asymétrique dans différents contextes cellulaires.

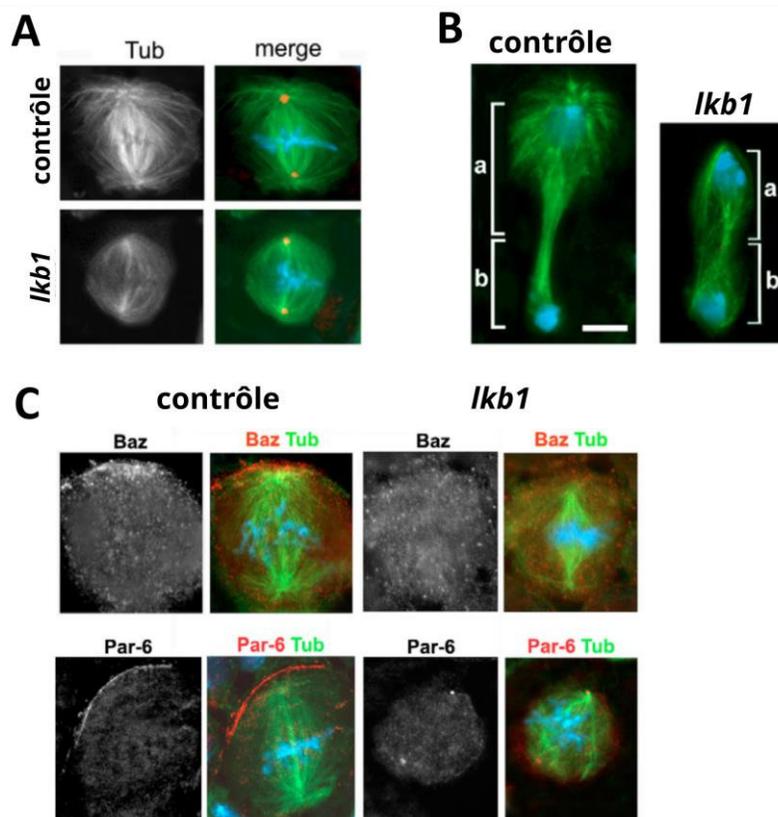


**Figure 48 : La polarité de l'ovocyte de drosophile est perturbée dans les mutants *lkb1*.**

(A, C, E, G, I) Ovocytes contrôles. (B, D, F, H, J) Ovocytes mutants *lkb1*. (A,B) Hybridation *in situ* de l'ARNm *oskar*. Au contraire du contrôle, le transcrit *oskar* ne s'accumule pas au pôle postérieur de l'ovocyte. (C,D) Hybridation *in situ* fluorescente de l'ARNm *bicoid*. (E,F) Marquage de la  $\beta$ -tubuline. (G,H) Localisation de la kinésine- $\beta$ -gal, détectée avec un anticorps dirigé contre  $\beta$ -gal. (I-J) Superposition des canaux de kinésine- $\beta$ -gal (rouge) et GFP-Staufen (vert). Images tirées de Martin and St Johnston, 2003.

Par exemple, la protéine LKB1 est impliquée dans la polarité de l'ovocyte (Martin and St Johnston 2003). L'axe antéro-postérieur de la drosophile est spécifié au cours de l'ovogénèse. Un gradient antéro-postérieur de microtubules au sein de l'ovocyte permet la localisation asymétrique de certains transcrits (fig. 48), tels que *bicoid* au pôle antérieur et *oskar* au pôle postérieur (Martin and St Johnston 2003). Les mutants *lkb1* ne présentent pas de cytosquelette de microtubules polarisé, ce qui empêche la localisation asymétrique de *bicoid* et *oskar* (fig. 48), et par conséquent, l'établissement de l'axe antéro-postérieur

(Martin and St Johnston 2003). Dans l'ovocyte, LKB1 est localisée au cortex cellulaire par prénylation. En effet, LKB1 présente un motif de prénylation en C-terminal qui est nécessaire pour sa localisation à la membrane plasmique. La mutation de ce site résulte en l'accumulation cytoplasmique de LKB1. Par ailleurs, cette localisation corticale de LKB1 est essentielle à sa fonction puisque la surexpression d'une forme mutée pour ce site de LKB1 ne permet pas de sauver le phénotype de déplétion de LKB1 (Martin and St Johnston 2003). Par ailleurs, cette étude révèle également que les cellules folliculaires des clones mutants pour *lkb1* montrent des défauts de polarité (Martin and St Johnston 2003). Dans les clones *lkb1* les plus sévèrement affectés, la monocouche folliculaire est désorganisée avec les cellules mutantes qui s'arrondissent et « sortent » en-dehors de l'épithélium. Les clones à la morphologie similaire aux contrôles montrent des défauts de la localisation apicale de aPKC et Armadillo, qui deviennent alors diffusés ou



**Figure 49 : LKB1 est requise pour la formation du fuseau de division et la division asymétrique des neuroblastes chez la drosophile.**

(A) Morphologie du fuseau des neuroblastes dans un contrôle et un mutant *lkb1*. Les cellules sont marquées pour la tubuline (Tub, vert), l'ADN (bleu) et la centrosomine (rouge). (B) Fuseau des neuroblastes dans un contrôle et un mutant *lkb1*. Chez le contrôle, il existe un axe long (a) et un axe court (b). Cette asymétrie est perdue dans les mutants *lkb1*. Barre d'échelle : 5  $\mu$ m. (C) Marquage de la tubuline (vert), de l'ADN (bleu) et de Bazooka ou Par-6 (rouge) dans des neuroblastes contrôles ou mutants *lkb1*. Images adaptées de Bonaccorsi et al., 2007.

localisées ectopiquement le long des membranes latérales (Martin and St Johnston 2003). La surexpression de la protéine LKB1 sauvage dans les clones mutants *lkb1* sauve le phénotype dans les cellules folliculaires. Ainsi, LKB1 est requise pour la polarité cellulaire des cellules de l'épithélium folliculaire chez la drosophile (Martin and St Johnston 2003).

Par ailleurs, LKB1 régule également la division asymétrique des neuroblastes chez la drosophile au stade larvaire (**fig. 49**) (Bonaccorsi et al. 2007). En tant que cellule souche neurale, le neuroblaste se divise pour former deux cellules filles de tailles différentes : une cellule large qui conserve l'identité du neuroblaste et une cellule plus petite qui sera amené à se différencier en neurone ou cellule gliale (Bonaccorsi et al. 2007). Comme le zygote de *C. elegans*, les neuroblastes sont polarisés avec au pôle apical le complexe Par (Par6, aPKC et Bazooka) et au pôle basal les déterminants de polarité Prospero, Numb, Brat et Miranda. Ainsi, l'orientation du fuseau mitotique est essentielle pour garantir la ségrégation correcte des déterminants d'identité dans les cellules filles issues de la division des neuroblastes. Les mutations de *lkb1* perturbent l'assemblage du fuseau mitotique, ce qui génère la formation de cellules polyploïdes (Bonaccorsi et al. 2007). En effet, le fuseau mitotique des mutants *lkb1* est plus court et composé d'une densité plus faible en microtubules (**fig. 49A**). De plus, les mutations de *lkb1* perturbent également l'asymétrie de la division du neuroblaste (**fig. 49B**) ; l'asymétrie de taille est moins présente, ce qui induit la formation d'une cellule fille neuroblaste plus petite que chez les contrôles (Bonaccorsi et al. 2007). Par ailleurs, la perte de fonction de LKB1 affecte la localisation de Miranda au pôle basal et du complexe Bazooka/Par6/aPKC au pôle apical (**fig. 49C**) (Bonaccorsi et al. 2007). Ainsi, LKB1 est requise pour la polarité et la division asymétrique des neuroblastes de la drosophile. Des expériences en immunofluorescence ont révélé que LKB1 est localisée dans le noyau et le cytoplasme des neuroblastes au cours de l'interphase des cellules neurales larvaires, dans uniquement dans le cytoplasme en cours de mitose (Bonaccorsi et al. 2007).

Un autre rôle de LKB1 a été décrit dans la régulation de la polarité apico-basale dans l'œil de la drosophile (Amin et al. 2009). Au cours du développement des photorécepteurs, la perte de LKB1 n'affecte pas l'établissement de la polarité mais induit un remodelage de la polarité : les protéines apicales aPKC et Par6 diffusent vers le pôle basal tandis que Arm s'étend vers la membrane basolatérale (Amin et al. 2009). Les mutants *lkb1* présentent également des jonctions plus longues et variables en longueur, avec parfois deux jonctions par cellule (Amin et al. 2009). Ainsi, LKB1 contrôle la longueur des jonctions dans l'épithélium de l'œil de la drosophile.

Par ailleurs, la déplétion de LKB1 est létale au stade embryonnaire ; les mutants ne se développent jamais en larves. Cela indique que LKB1 est critique au développement embryonnaire chez la drosophile. Dans les embryons *lkb1*, de nombreux défauts de polarité sont observés dans les épithélia (Lee et al. 2007). En effet, le marqueur apical Bazooka et le marqueur de jonctions Arm perdent leur localisation strictement apicale et sont retrouvées au niveau des surfaces cellulaires basolatérales (Lee et al. 2007). De plus, le marqueur basolatéral Dlg est également distribué de manière irrégulière à travers les épithélia des embryons mutants *lkb1*. Le marquage de l'actine montre que l'épithélium de ces embryons contient de nombreuses cellules non polarisées arrondies qui ont perdu contact avec les tissus sous-jacents (Lee et al. 2007). Par ailleurs, les disques imaginaux des mutants *lkb1* montrent des défauts d'organisation épithéliale avec des structures riches en actine ectopique à la région basolatérale (Lee et al. 2007). Dans ces contextes, la protéine AMPK est un médiateur essentiel de LKB1 afin de contrôler la polarité épithéliale dans l'embryon de la drosophile (Lee et al. 2007).

## 2) Dans les cellules épithéliales en culture

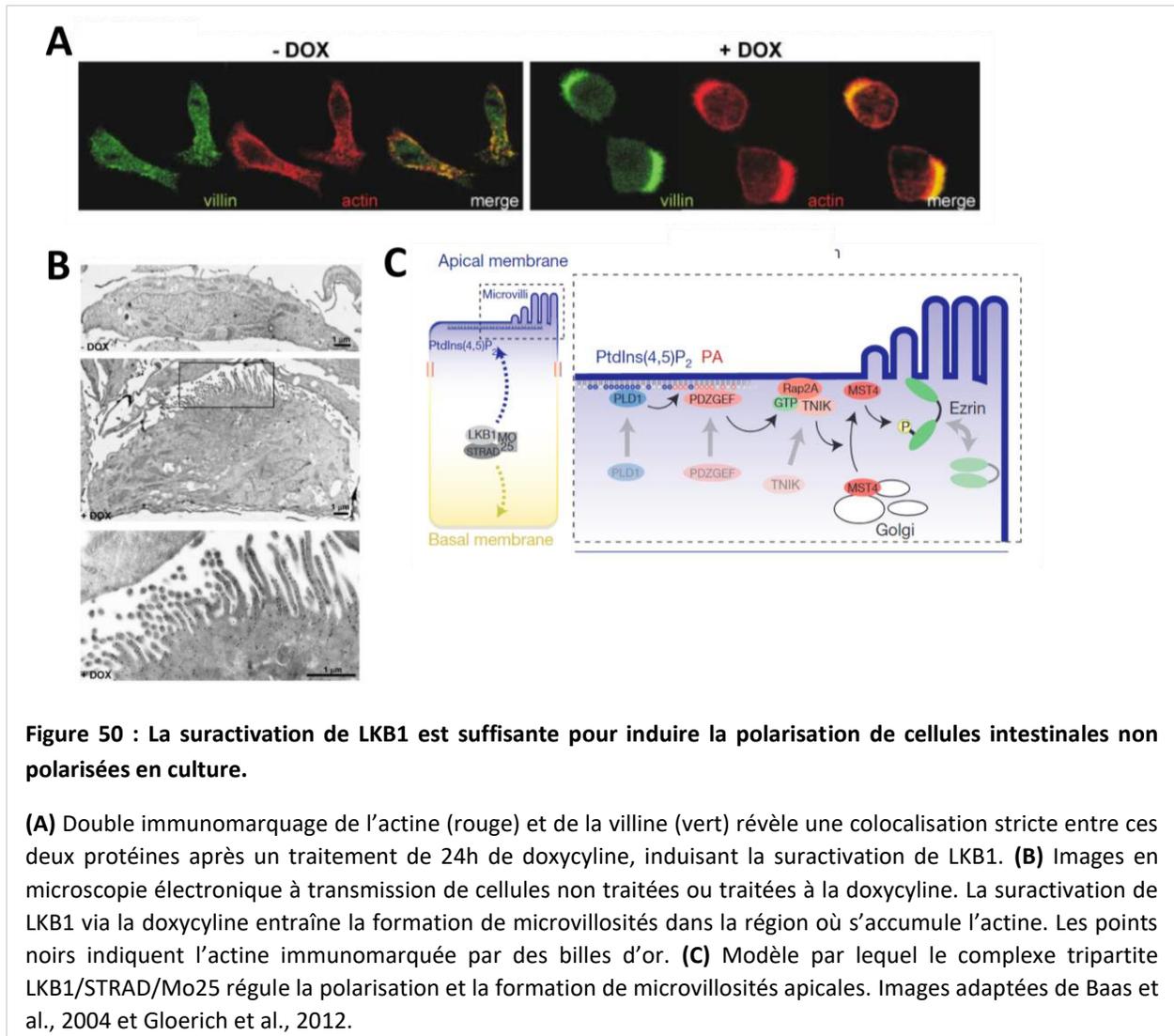
En plus des organismes modèles, la protéine LKB1 a également été caractérisée en tant que régulatrice de la polarité au sein de cellules épithéliales de mammifère.

En 2004, Baas et ses collaborateurs ont publié une étude démontrant un rôle de LKB1 dans la polarisation de cellules épithéliales intestinales en culture (Baas et al. 2004). Ils ont généré une lignée cellulaire issue de cellules épithéliales du colon, permettant la surexpression de STRAD via un système d'induction à la doxycycline (Baas et al. 2004). Cette lignée, nommée LS174T-W4, est constituée de cellules isolées à cause d'une mutation pour la E-cadhérine. Ainsi, ils ont créé un modèle de suractivation de LKB1 dans des cellules non polarisées en culture (Baas et al. 2004). Dans ce système, ils ont testé l'effet de la suractivation de LKB1 sur la polarité des cellules. En conditions normales, le cytosquelette d'actine dans cette lignée cellulaire est localisé aux points focaux d'adhésion, aux fibres de stress ainsi qu'au cortex cellulaire (Baas et al. 2004). L'induction de l'expression de STRAD, et donc la suractivation de LKB1, entraîne une réorganisation complète du cytosquelette d'actine qui s'accumule à un pôle cellulaire et forme des structures similaires à des microvillosités, visibles en microscopie électronique (**fig. 50A-B**) (Baas et al. 2004). La villine, constituant de la bordure en brosse chez les mammifères, se retrouve localisée au niveau de ces structures (**fig. 50A**). De plus, l'activation de LKB1 permet un tri sélectif de marqueurs membranaires au pôle apical ou basolatéral (Baas et al. 2004). Ainsi, LKB1 est suffisante pour induire la polarisation complète de cellules épithéliales intestinales isolées en culture.

Des études suivantes ont caractérisé la voie de signalisation par laquelle LKB1 agit, quand elle est suractivée, pour induire la formation d'une bordure en brosse apicale (Gloerich et al. 2012; ten Klooster et al. 2009). La fonction de LKB1 dans la polarisation des cellules intestinales en culture LS174T-W4 nécessite son partenaire Mo25, en plus de STRAD qui est surexprimé dans ce système cellulaire ((ten Klooster et al. 2009). Par ailleurs, la suractivation de LKB1, au sein du complexe tripartite avec STRAD et Mo25, active une cascade de signalisation pour *in fine* phosphoryler l'ézrine et induire la formation de microvillosités (**fig. 50C**). La polarisation apico-basale induite par LKB1 résulte en la distribution asymétrique de composants cellulaires, notamment de lipides membranaires (Gloerich et al. 2012). Au pôle apical, les lipides PIP(4,5)P2 servent de plateforme polarisée pour localiser des complexes de signalisation à la membrane. Cela entraîne la génération d'acide phosphatidique (PA) localement qui active une cascade de signalisation impliquant la protéine Rap2A (Rap small G protein) et la protéine kinase Mst4 qui phosphoryle directement l'ézrine (**fig. 50C**), permettant la formation de microvillosités (Gloerich et al. 2012; ten Klooster et al. 2009).

Par ailleurs, la protéine LKB1 est retrouvée localisée à la membrane dans des modèles de cellules épithéliales polarisées de mammifères telles que la lignée de cellules du colon Caco-2 (Cancer coli, Colorectal AdenoCarcinome) et la lignée de cellules rénales MDCK II (Madin-Darby Canine Kidney II) (Sebbagh et al. 2009). En effet, une séquence en C-terminale est utilisée comme site de prénylation, et permet ainsi la liaison de LKB1 à la membrane plasmique (Sapkota et al. 2001).

Dans des cellules épithéliales bronchiales, la déplétion de LKB1 perturbe la localisation des protéines jonctionnelles E-cadhérine et ZO-1 (Xu et al. 2013). Cette régulation de LKB1 est indépendante de son activité kinase.



### 3) Dans l'embryon de souris

Alors que LKB1/PAR-4 sont essentielles à l'établissement de la polarité chez le nématode et la drosophile (Martin and St Johnston 2003; Morton et al. 1992), la déplétion de LKB1 n'affecte pas la polarisation et la spécification des cellules de l'épiblaste, de l'endoderme primitif et du trophoctoderme dans l'embryon précoce de souris (Krawchuk et al. 2015). En effet, au cours des stades préimplantatoires, les embryons murins *lkb1(null)* présentent une polarité cellulaire similaire aux contrôles. De plus, la ségrégation des déterminants d'identité cellulaire tels que Nanog (épiblaste), SOX17 (endoderme primitif) et CDX2 (trophoctoderme) s'établit correctement (Krawchuk et al. 2015). En revanche, la déplétion de LKB1 induit un processus anormal d'extrusion de cellules vers les pôles apical et basal (Krawchuk et al. 2015). Ces cellules extrudées expriment correctement les marqueurs de polarité cellulaire tels que la E-

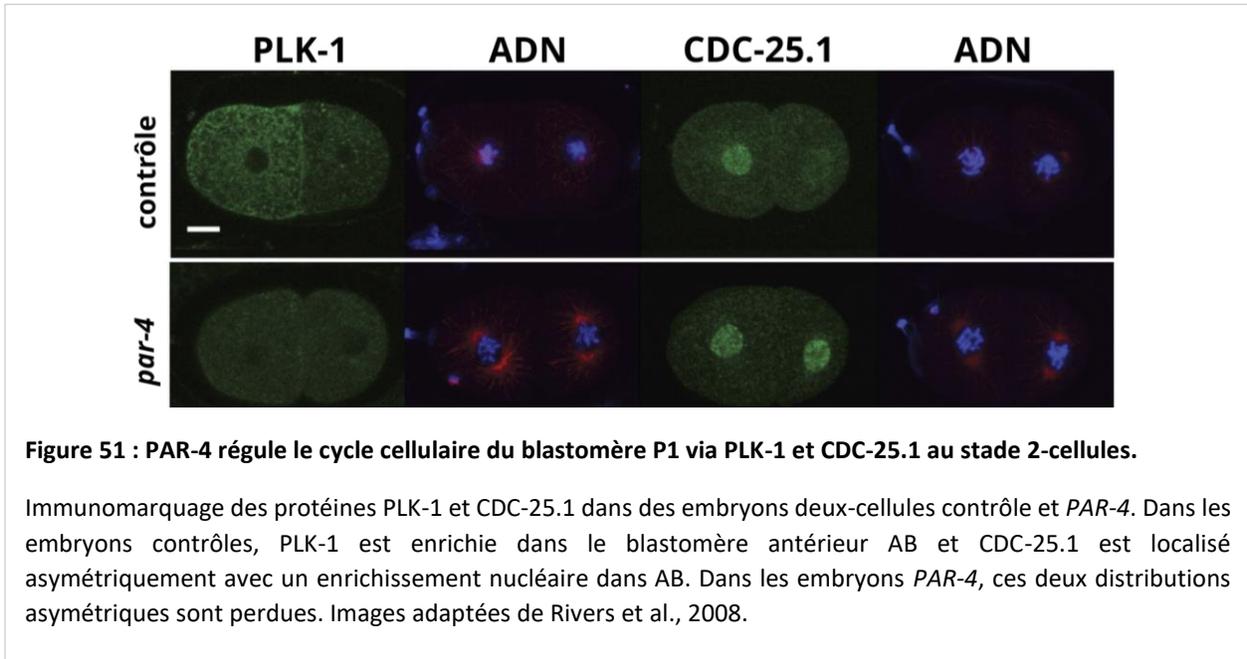
cadhérine, l'actine ou aPKC. Les résultats de l'étude suggèrent que LKB1 est requise afin que les cellules épithéliales issues de division puissent réintégrer l'épithélium après la division. LKB1 est requise de manière cellulaire autonome pour empêcher ces extrusions cellulaires, (Krawchuk et al. 2015). Les mécanismes cellulaires de ce processus ne sont pas connus. Toutefois, il existe une interaction génétique entre LKB1 et la protéine de jonctions E-cadhérine. En effet, l'expression réduite de la E-cadhérine augmente fortement la fréquence d'extrusion cellulaire dans les embryons *lkb1(null)* (Krawchuk et al. 2015). Ainsi, les extrusions épithéliales pourraient être causées par des défauts de la dynamique des jonctions.

### b. Cycle cellulaire

Les protéines PAR-4/LKB1 peuvent également réguler le cycle cellulaire.

Chez *C. elegans*, le zygote P0 se divise pour produire une grande cellule antérieure, nommée AB et une plus petite cellule postérieure, appelée P1. Ces cellules filles ont une longueur de cycle cellulaire distincte : AB se divise environ deux minutes avant P1 (Rivers et al. 2008). Il a été montré que cette asynchronie de division au stade 2-cellules est causée par une plus longue phase S dans le blastomère P1 par rapport à celle du blastomère antérieur AB (Brauchle, Baumer, and Gönczy 2003; Edgar and McGhee 1988). Les protéines PAR contribuent de manière essentielle à la régulation de cette asynchronie. En effet, dans les mutants *par*, les cellules AB et P1 se divisent de façon synchrone (Kemphues et al. 1988; Watts et al. 2000). Par ailleurs, cette asynchronie dans l'embryon 2-cellules repose également sur la localisation différentielle de composants clés du cycle cellulaire (**fig. 51**) (Rivers et al. 2008). Ainsi, la phosphatase CDC-25.1 est enrichie dans le noyau de la cellule AB. Elle est également détectée dans le noyau de la cellule P1, mais à plus faibles niveaux protéiques (Rivers et al. 2008). De plus, elle est requise pour la régulation correcte du temps de division des cellules AB et P1 (Rivers et al. 2008). En effet, une faible déplétion de CDC-25.1 par interférence à l'ARN induit un allongement des cycles de division de AB et P1. En outre, dans ces conditions génétiques, AB se divise environ 5 minutes avant P1, contrairement à deux minutes dans les embryons contrôles (Rivers et al. 2008). Il a été montré que l'accumulation nucléaire est régulée par la protéine Polo-like kinase PLK-1, qui est normalement enrichie dans la cellule AB (Rivers et al., 2008). La faible déplétion de PLK-1 augmente la durée des cycles de AB et P1 en réduisant l'accumulation nucléaire de CDC-25.1 dans AB et P1 (Rivers et al. 2008). Enfin, la protéine PAR-4 contrôle l'enrichissement antérieur de PLK-1, et donc, les niveaux nucléaires asymétriques de CDC-25.1 dans l'embryon 2-cellules (**fig. 51**) (Rivers et al. 2008). En effet, dans les embryons *par-4*, les protéines PLK-1 et CDC-25.1 deviennent

symétriquement localisées dans les cellules AB et P1 (**fig. 51**); la phase S est alors accélérée dans le blastomère postérieur P1 qui adopte alors un cycle cellulaire plus rapide, similaire au cycle de AB dans les embryons contrôles (Rivers et al. 2008).



Par ailleurs, une étude suivante a montré que le blastomère AB présente un nombre plus important d'origines de réplication de l'ADN que le blastomère P1 pendant la phase S précoce (Benkemoun et al. 2014). En effet, les auteurs ont observé la localisation nucléaire de la protéine PCN-1 fusionnée à la GFP, l'orthologue chez le nématode de PCNA (proliférant cell nucléar antigen). PCNA fonctionne en tant que facteur de processivité pour la réplication et est localisé aux sites actifs de réplication de l'ADN (Essers et al. 2005). Ainsi, le blastomère AB présente une plus large région nucléaire riche en signal fluorescent GFP::PCN-1 comparé au blastomère P1 (Benkemoun et al. 2014). Cette asymétrie est perdue dans les embryons *par-4*, indiquant que la réplication de l'ADN est anormalement symétrique entre les deux blastomères lors de la perte de fonction de PAR-4. De plus, il a été montré que PAR-4 régule l'asymétrie de la réplication de l'ADN au stade 2-cellules de indépendamment de l'activité de PLK-1 (Benkemoun et al. 2014; Rivers et al. 2008). En effet, la déplétion partielle de PLK-1 dans les embryons contrôles ou mutants *par-4* n'a pas d'effet sur la distribution nucléaire de GFP::PCN-1 dans les blastomères AB et P1 (Benkemoun et al. 2014). Ainsi, PAR-4 exerce non seulement un rôle sur la ségrégation de certains facteurs importants du cycle cellulaire mais régule également négativement l'initiation de la réplication de l'ADN dans le blastomère P1 au stade 2-cellules.

Dans la lignée cellulaire humaine cancéreuse issue de mélanome G361, il a été montré que les niveaux cellulaires en ARN messagers de *lkb1* sont faibles comparés aux niveaux basaux ubiquitaires des tissus humains normaux adultes ou embryonnaires (Tiainen, Ylikorkala, and Mäkelä 1999). Cet enrichissement faible en transcrits *lkb1* est associée à une diminution de l'activité kinase de la protéine LKB1 (Tiainen et al. 1999). La surexpression de LKB1 dans ces cellules induit un arrêt de la croissance cellulaire en phase G1 (Tiainen et al. 1999). Ce rôle de LKB1 dans le cycle cellulaire dépend de son activité kinase mais aussi de sa localisation subcellulaire. En effet, la surexpression de protéines LKB1 mutées avec une activité kinase déficiente n'induit pas d'arrêt de la croissance cellulaire (Tiainen et al. 1999). Par ailleurs, les protéines LKB1 cytoplasmiques sont suffisantes pour induire l'arrêt en phase G1 (Tiainen et al. 2002). De plus, LKB1 active la transcription de p21, l'inhibiteur de CDK (cycline-dependant kinase) et entraîne ainsi une diminution de l'activité des complexes cyclines/CDK impliqués dans la phase G1 (Tiainen et al. 2002). Par ailleurs, l'induction de la transcription de p21 est dépendante de l'activité de p53 (Tiainen et al. 2002).

En outre, les fibroblastes embryonnaires de souris déficientes en LKB1 cultivés en culture (MEFs) présentent également un arrêt en phase G1 et une expression réduite de p53 et p21 (Bardeesy et al. 2002). Il a été montré que LKB1 peut phosphoryler p53 *in vitro* mais aussi dans la lignée de cellules cancéreuses humaines de colons cellulaire HCT116 (human colorectal carcinoma) *in vivo* (Zeng and Berger 2006). La phosphorylation de p53 par LKB1 à deux résidus distincts est nécessaire pour l'arrêt en phase G1 (Zeng and Berger 2006). Par ailleurs, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont permis de montrer que LKB1 s'associe avec le promoteur du gène *p21* et augmente l'interaction de p53 sur le promoteur de *p21*. Réciproquement, p53 est aussi requis pour recruter LKB1 au promoteur de *p21* (Zeng and Berger 2006).

### **c. Prolifération cellulaire et apoptose**

LKB1 démontre de nombreuses fonctions cellulaires, y compris dans la régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose.

Il a été montré que la surexpression de LKB1 induit l'activation de l'apoptose caspase-dépendante dans une lignée de cellules de fibrosarcome (HT1080) (Karuman et al. 2001). Ce processus dépend de l'activité kinase de LKB1. Par ailleurs, la mort cellulaire par apoptose induite par LKB1 dépend de p53 ; LKB1 et p53 interagissent *in vitro* (Karuman et al. 2001).

Chez les larves de drosophile, la surexpression de la forme sauvage de LKB1 entraîne une réduction de la taille de certains organes tels que les disques imaginaux de l'œil et de l'aile (J. H. Lee et al. 2006). Ce rôle nécessite son activité d'enzyme kinase, puisque la surexpression de la forme mutée de LKB1 n'induit pas ce phénotype. Le gain de fonction de LKB1 ne réduit pas la taille des cellules individuelles mais du clone entier (J. H. Lee et al. 2006). Au contraire, les embryons mutants *lkb1(null)* présentent une hyperplasie du cerveau (J. H. Lee et al. 2006). La surexpression ectopique de LKB1 sauve ce phénotype d'hyperplasie. Dans cette étude, des expériences d'incorporation au bromodeoxyuridine (BrdU) ou de marquage de la phospho-histone 3 ont permis de montrer que la surexpression de LKB1 n'entraîne pas de défaut du cycle cellulaire dans les disques imaginaux de l'œil et l'aile (J. H. Lee et al. 2006). En revanche, des marquages cellulaires à l'acridine orange dans les disques imaginaux de l'œil ont révélé que LKB1 induit une mort cellulaire par apoptose caspase-dépendante (J. H. Lee et al. 2006). Au cours du développement, dans le cerveau des embryons *lkb1(null)*, un nombre anormalement faible de cellules apoptotiques a été décrit, notamment dans la région de la tête, associée à une hyperplasie cérébrale (J. H. Lee et al. 2006). Ainsi, LKB1 régule également la taille du cerveau au cours de l'embryogenèse en induisant une apoptose. Les auteurs ont montré que cette régulation de la mort cellulaire ne fait pas intervenir p53 mais la voie de signalisation JNK (c-Jun N-terminal kinase) (J. H. Lee et al. 2006). En effet, l'activation de la voie JNK dans des embryons *lkb1(null)* permet de restaurer l'apoptose embryonnaire et de restreindre la taille du cerveau (J. H. Lee et al. 2006). Par ailleurs, JNK est également indispensable à l'apoptose induite par LKB1 dans les disques imaginaux de l'œil et de l'aile chez les larves. Ainsi, la voie JNK, en aval de LKB1, contrôle l'apoptose et la taille des organes en réponse à l'activité kinase de LKB1, au cours du développement embryonnaire et larvaire.

Néanmoins, une dizaine d'années plus tard, Gailite et ses collaborateurs ont montré que les embryons mutants *lkb1(null)* ont une hyperplasie du cerveau associée à une prolifération cellulaire excessive observée par un nombre élevé de cellules mitotiques positives au marquage de la phosphohistone 3 (Gailite, Aerne, and Tapon 2015). Cette accélération de la prolifération cellulaire, induisant une hyperplasie tissulaire, est médiée par le facteur de transcription Yki<sup>YAP</sup> couramment impliqué dans la voie Hpo<sup>Hippo</sup>. La voie de signalisation Hippo est conservée et joue un rôle crucial dans la régulation de la taille des organes au cours du développement via la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire ou la mort cellulaire (Saucedo and Edgar 2007). Toutefois, dans le cerveau en développement de la drosophile, LKB1 régule la prolifération cellulaire en agissant sur l'activité de Yki<sup>YAP</sup> indépendamment de Hpo<sup>Hippo</sup> mais via le régulateur du métabolisme cellulaire AMPK (Gailite et al. 2015).

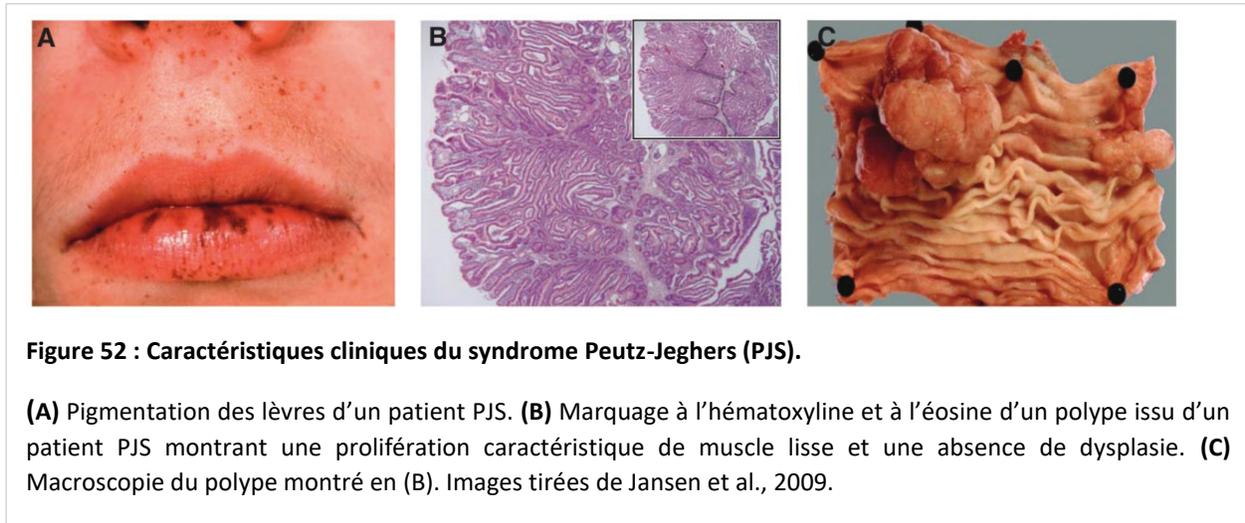
Chez le poisson-zèbre, LKB1 est exprimée à tous les stades larvaires dans la majorité des tissus (Marshall et al. 2010). La localisation subcellulaire de LKB1 évolue au cours du développement de l'intestin : dans le cytoplasme dans l'intestin primitif, puis dans le noyau et enfin, dans le cytoplasme alors que l'épithélium est différencié (Marshall et al. 2010). La distribution subcellulaire de LKB1 dans l'épithélium intestinal murin est similaire à celle caractérisée dans le poisson-zèbre (Marshall et al. 2010). Par ailleurs, la localisation nucléaire de LKB1 induit l'activation par phosphorylation de TORC1 (target of rapamycin complex), acteur de la voie de signalisation TOR. Chez le poisson-zèbre, la voie de signalisation TOR est requise pour la transition endoderme-intestin (Makky, Tekiela, and Mayer 2007). Cette dernière correspond à l'ensemble des processus cellulaires (morphogénèse, prolifération et différenciation) qui aboutissent à la formation d'un épithélium intestinal constitué d'une seule couche de cellules et capable d'absorber des nutriments (Marshall et al., 2010). La perte de fonction partielle de LKB1 induit une augmentation du nombre de cellules épithéliales intestinales suite à une augmentation de la prolifération cellulaire (Marshall et al. 2010). Par ailleurs, la perte de fonction partielle de LKB1 promeut également une différenciation intestinale précoce. Les gènes intestinaux sont exprimés plus tôt que dans les conditions contrôles et la lumière intestinale s'ouvre également précocement (Marshall et al. 2010). La suractivation de TORC1 induit le même phénotype. Ainsi, chez le poisson-zèbre, en agissant via TORC1, LKB1 contrôle la croissance intestinale et la temporalité du programme génétique de différenciation intestinale. Les auteurs émettent l'hypothèse que ces fonctions de LKB1 sont directement reliées aux changements de localisation subcellulaire au cours du développement de l'intestin (Marshall et al. 2010).

### **3. Les rôles de LKB1/PAR-4 chez l'être humain et la souris**

#### **a. Implication de LKB1 dans le syndrome de Peutz-Jeghers**

En 1998, deux laboratoires différents ont révélé l'implication du gène *lkb1<sup>stk11</sup>* dans le Syndrome de Peutz-Jeghers (PJS) (Hemminki et al. 1998; Jenne et al. 1998). Le PJS a été décrit pour la première fois en 1922 par le Dr Johannes Peutz. Le médecin allemand a décrit les symptômes d'un patient âgé de 15 ans. Celui-ci présentait de multiples polypes intestinaux ainsi qu'une hyperpigmentation autour de la bouche (**fig. 52**) (pour revue : (Jansen et al. 2009)). Par ailleurs, d'autres membres de la famille présentaient des symptômes similaires. Ce jeune adolescent a déclaré un cancer neuf années plus tard. Par la suite, dans les années 1940, Dr Harold Jeghers et ses collaborateurs ont mieux caractérisé le syndrome. Ils émettent dès lors l'hypothèse de l'implication d'un seul gène responsable de l'ensemble des

symptômes observés (pour revue : (Jansen et al. 2009)). Cet historique a conféré le nom du symptôme en référence à Peutz et Jeghers.



Le premier signe clinique du PJS est l'hyperpigmentation de la peau et des muqueuses observée tôt au cours de l'enfance du patient (**fig. 52A**). Toutefois, les polypes constituent le symptôme clinique majeur du PJS. Ils peuvent se développer tout le long du tractus digestif (**fig. 52B,C**). En grossissant, ils peuvent entraîner des occlusions du tractus gastro-intestinal, douloureuses et générant des saignements avec un risque d'anémie (pour revue : (Jansen et al. 2009)). Les polypes du PJS sont localisés de façon prédominante dans l'intestin grêle, mais ils ont aussi été décrits à l'extérieur du tractus gastro-intestinal (trachée, tractus uro-génital, nasopharynx). Le PJS est une maladie héréditaire à transmission autosomique dominante. Elle est rare, avec une incidence entre 1/50 000 et 1/200 000 (pour revue : (Jansen et al. 2009)). Les symptômes mécaniques dus au développement des polypes chez les patients atteints de PJS sont prédominants au cours des 20 premières années de la vie du patient. Toutefois, avec l'âge, l'apparition de cancers devient une préoccupation clinique majeure. En effet, il a été estimé via des études basées sur de grandes cohortes que les patients atteints du PJS présentent un risque de cancer 18 fois plus élevé que la population normale. Par ailleurs, il a été également estimé que 93% des patients PJS développent des tumeurs malignes avant l'âge de 43 ans (pour revue : (Yoo et al., 2002)). Le PJS prédispose à un spectre de tumeurs très large qui touche principalement le tractus gastro-intestinal, mais aussi le poumon, pancréas, ovaires, sein et col utérin. Par ailleurs, le risque de développer un cancer du sein chez les patientes atteintes de PJS est similaire à celui des femmes porteuses de mutations des gènes *Brca1* ou *Brca2*.

L'implication du gène *lkb1* dans le PJS a été démontrée en 1997 via une analyse par hybridation génomique comparative. Effectuée sur une cohorte de polypes de patients atteints de PJS (Hemminki et al. 1997), cette analyse a révélé une délétion du chromosome 19p13. Par la suite, la recherche de mutations de gènes situés dans cette région génomique a permis d'identifier des mutations du gène *lkb1*, aussi nommé *stk11* (Hemminki et al. 1998; Jenne et al. 1998). Dans les familles atteintes du PJS, environ 150 mutations germinales du gène *lkb1* ont été caractérisées (pour revue : (Alessi et al. 2006)). La majorité de ces mutations résulte en la production d'une protéine LKB1 dont le domaine catalytique est tronqué, suggérant une perturbation de son activité kinase. Il existe aussi des mutations ponctuelles localisées dans le domaine kinase mais aussi dans la région non-catalytique C-terminale. De façon intéressante, aucune mutation ponctuelle dans la région non-catalytique N-terminale n'a été identifiée, suggérant que cette région de la protéine LKB1 n'est pas cruciale pour son rôle dans le PJS (pour revue : (Alessi et al., 2006)).

Chez les patients atteints de PJS, les polypes sont correctement différenciés avec la présence de microvillosités au pôle apical des entérocytes observées en MET (Weller and McColl 1966). Ils présentent une morphologie cellulaire normale et sont bénins. En général, les hamartomes proviennent d'une prolifération cellulaire aberrante tout en conservant les couches cellulaires épithéliales distinctes du tissu d'origine. Ils présentent une augmentation de la taille et du nombre des cellules épithéliales, combinée à l'augmentation du stroma autour (Jansen et al. 2009).

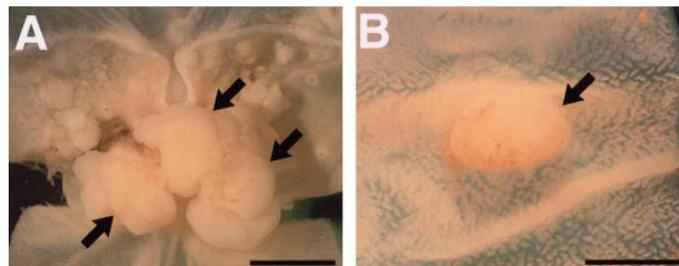
Presque tous les polypes prélevés sur des patients atteints de PJS montrent une expression normale de LKB1 au niveau des cryptes de l'épithélium intestinal (Rowan et al. 2000). Une autre étude nuance toutefois ces observations. En effet, dans des échantillons issus de patients atteints de PJS, les auteurs ont trouvé une expression normale de LKB1 dans les régions normales de l'épithélium intestinal adjacent ou entre les polypes (Karuman et al. 2001). En revanche, la protéine LKB1 est absente au sein des polypes PJS. Les cancers montrent une expression de LKB1 nettement plus variable avec des tumeurs ayant de forts niveaux protéiques de LKB1, d'autres avec peu ou pas de protéines LKB1 ou encore d'autres avec un niveau protéique intermédiaire (Rowan et al. 2000).

Chez les patients atteints de PJS, les polypes intestinaux présentent un taux spontané d'apoptose plus bas par rapport aux tissus adjacents (Karuman et al. 2001). Il existe une forte corrélation entre l'expression de LKB1 et la présence d'apoptose, suggérant que la déficience sévère de l'apoptose cellulaire dans les polypes PJS puisse jouer un rôle dans la formation d'hamartomes bénins. Toutefois, la détection de p53 par immunomarquage dans les échantillons intestinaux de patients PJS ne révèle pas d'expression

différente par rapport aux échantillons sains (Karuman et al. 2001). Cela suggère que les polypes issus de patients PJS maintiennent une expression normale de p53.

### b. Modèles de PJS chez la souris : étude des polypes

Afin de définir la fonction de LKB1 dans un modèle de mammifères mais aussi de caractériser les mécanismes cellulaires sous-jacents à la formation des polypes chez les patients atteints de PJS, des laboratoires ont généré des lignées de souris portant des mutations au locus *lkb1* (Jishage et al. 2002; Miyoshi et al. 2002). Dans ces modèles, le gène *lkb1* a été inactivé de manière hétérozygote (*lkb1*<sup>+/-</sup>) en conservant un allèle sauvage établissant ainsi un modèle de perte de fonction partielle de LKB1. Par ailleurs, le gène *lkb1* peut aussi être inactivé de manière homozygote (*lkb1*<sup>-/-</sup>) avec les deux loci déplétés, établissant ainsi un modèle de perte de fonction totale de la protéine.



**Figure 53 : Les souris *lkb1*<sup>+/-</sup> développent des polypes gastrointestinaux.**

(A,B) Observation de polypes gastriques (A) et un petit polype intestinal (B). Images tirées de Miyoshi et al., 2002.

Les souris *lkb1*<sup>-/-</sup> meurent *in utero* : LKB1 est donc essentielle au développement de l'organisme (Jishage et al. 2002; Miyoshi et al. 2002). Les souris montrent notamment des défauts de fermeture du tube neural et du développement vasculaire (Ylikorkala et al. 2001) En revanche, une expression réduite de LKB1 suffit à maintenir à la survie puisque les souris *lkb1*<sup>+/-</sup> se développent normalement et ne montrent pas de phénotype majeur jusqu'à l'âge d'environ 20 semaines (Jishage et al. 2002; Miyoshi et al. 2002). Toutefois, les souris *lkb1*<sup>+/-</sup> commencent ensuite à développer des polypes gastrointestinaux (Bardeesy et al. 2002; Jishage et al. 2002; Miyoshi et al. 2002; Rossi et al. 2002). Alors que les polypes chez les patients PJS sont localisés pour la majorité dans l'intestin grêle, les polypes des souris *lkb1*<sup>+/-</sup> sont situés principalement au niveau de l'estomac (**fig. 53**) (Jishage et al. 2002). Des polypes ont aussi été retrouvés au niveau de l'intestin grêle des souris *lkb1*<sup>+/-</sup> plus âgées (> 50 semaines) (Miyoshi et al. 2002). Ces polypes

montrent une différenciation similaire aux contrôles avec les couches cellulaires épithéliales normales. Leur surface est recouverte de cellules du muscle squelettique positives au marquage de l' $\alpha$ -SMA. Ainsi, la caractérisation histologique montre que les polypes *lkb1<sup>+/-</sup>* sont similaires aux hamartomes présentes dans les patients PJS (Jishage et al. 2002; Miyoshi et al. 2002). L'expression du gène *lkb1* a été analysée au niveau de ces polypes gastriques dans les souris *lkb1<sup>+/-</sup>* : la quantité de transcrits de *lkb1* est diminuée environ d'un facteur de 2, de même que les niveaux protéiques de LKB1, ce qui est cohérent avec l'hétérozygotie de la lignée (Jishage et al. 2002; Miyoshi et al. 2002). Ainsi, les polypes ne se développent pas à cause de la perte de l'hétérozygotie, avec par exemple une mutation somatique qui inactiverait le second allèle du locus *lkb1*, induisant la perte totale de LKB1. Ces résultats sont cohérents car les polypes des patients PJS présentent également une expression de LKB1 (Rowan et al. 2000). Par ailleurs, les souris *lkb1<sup>+/-</sup>* âgées de plus de 30 semaines développent également des carcinomes hépatocellulaires (Miyoshi et al. 2002), confirmant que LKB1 joue un rôle de suppresseur de tumeur dans le foie. Par ailleurs, à cause des polypes gastrointestinaux, la majorité des souris *lkb1<sup>+/-</sup>* montrent des symptômes d'obstruction gastrointestinale à l'âge moyen de 43 semaines (Bardeesy et al. 2002).

Dans les polypes des souris *lkb1<sup>+/-</sup>*, la voie de signalisation Wnt n'est pas activée. En effet, la  $\beta$ -caténine demeure en-dehors des noyaux des cellules épithéliales des polypes et est localisée à la membrane basolatérale (Miyoshi et al. 2002). En revanche, les polypes des souris *lkb1<sup>+/-</sup>* présentent une forte activation de la voie de signalisation mTOR (Shaw et al. 2004). De plus, l'ajout de rapamycine, l'inhibiteur de mTOR, inhibe la croissance des polypes déjà développés (Wei et al. 2008).

Ces polypes gastrointestinaux sont-ils reliés à la fonction de LKB1 au sein du tractus digestif ou à son rôle dans un tissu en-dehors de celui-ci ? Pour répondre à cette question, plusieurs laboratoires ont généré des lignées de souris dans lesquelles le gène a été délété de manière hétérozygote ou homozygote dans un type cellulaire spécifique en utilisant le système génétique Lox/Cre (Sauer 1998).

La déplétion du domaine kinase de la protéine LKB1 spécifiquement dans les cellules intestinales épithéliales ne semble pas affecter la polarité épithéliale, ni la structure de la bordure en brosse (Shorning et al. 2009). En revanche, cela affecte la taille et la morphologie des cellules sécrétrices, à savoir les cellules de Paneth et les cellules de Goblet (Shorning et al. 2009). La déplétion de LKB1 altère la voie de signalisation Notch et induit une différenciation anormale des cellules sécrétrices intestinales. LKB1 est connue pour agir sur la voie mTOR notamment via AMPK. Cependant, aucune altération de la phosphorylation de AMPK ou de la voie de signalisation mTOR n'a été observé (Shorning et al. 2009). Les auteurs n'ont toutefois pas décrit la présence potentielle de polypes dans ce modèle de souris.

La déplétion partielle de LKB1 spécifiquement dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle et du colon a été effectuée dans les souris nommées *lkb1<sup>fl/+</sup>; villin-Cre* (Poffenberger et al. 2018). Ces souris ne développent pas de polypes gastro-intestinaux, même lorsqu'elles sont âgées de plus de 52 semaines. Cela suggère que le développement de polypes dans les souris déplétées en LKB1 et chez les patients PJS pourrait être dû à une fonction de LKB1 en-dehors du tissu intestinal. En revanche, la même étude montre un résultat surprenant : la déplétion partielle de LKB1 spécifiquement dans les lymphocytes T est associée à la formation de polypes, avec une incidence similaire à celle observée dans les souris *lkb1<sup>+/-</sup>* (Poffenberger et al. 2018). Ainsi, la déplétion de LKB1 dans les lymphocytes T suffit pour promouvoir le développement de polypes. Ce résultat montre que l'origine des polypes n'est pas entièrement reliée à un processus autonome cellulaire. Par ailleurs, le développement de polypes est également observé quand les fibroblastes et cellules du muscle lisse du stroma sont partiellement déplétées en LKB1 (Ollila et al. 2018), montrant que la déplétion hétérozygote de LKB1 dans le stroma est suffisante pour induire des symptômes similaires aux souris *lkb1<sup>+/-</sup>* constituant le modèle murin de PJS. Enfin, la déplétion partielle ou totale de LKB1 spécifiquement dans les cellules du muscle squelettique lisse induit également le développement de polypes gastro-intestinaux (Katajisto et al. 2008). Dans ces polypes, aucune altération de l'activité de AMPK ou de la voie mTOR n'a été observée (Katajisto et al. 2008), suggérant une voie alternative pour promouvoir la polypose. Ainsi, la fonction de LKB1 pour empêcher la formation de polypes ne semble pas liée à la présence de LKB1 dans l'épithélium intestinal.

### c. LKB1, un suppresseur de tumeur

Les mutations de *lkb1* au sein de la lignée germinale qui conduisent au développement du PJS résultent en la perte de fonction partielle de LKB1. Les patients atteints de PJS présentent un risque accru de développer certains cancers, en premier lieu dans le tractus gastro-intestinal mais aussi dans le sein, poumon, utérus, ovaires et testicules (pour revue : (Alessi et al. 2006)). Par ailleurs, des mutations somatiques de *lkb1* ont été décrites dans 30% des adénocarcinomes du poumon (Ji et al., 2007 ; pour revues : (Bourrouh and Marignani, 2022; Sanchez-Cespedes, 2007). Cela supporte un rôle de la perte de fonction de LKB1 dans l'origine de certaines tumeurs sporadiques.

Depuis la découverte de LKB1 en 1988, de nombreuses études ont montré ses multiples fonctions cellulaires telles que l'inhibition de la progression du cycle cellulaire, un retard de la croissance cellulaire, la mort cellulaire par apoptose ou encore le contrôle de la polarité cellulaire.

La protéine kinase LKB1 possède de nombreuses cibles cellulaires, notamment de la famille AMPK (pour revues : (Alessi et al., 2006; Lizcano et al., 2004)). Le substrat majeur de LKB1 est le régulateur du métabolisme cellulaire AMPK. La voie de signalisation LKB1-AMPK inhibe notamment le complexe mTORC1. Ce dernier est impliqué dans la croissance cellulaire et la division mais aussi dans le métabolisme cellulaire. Ainsi, LKB1, via AMPK, contrôle ces processus prolifératifs. Par ailleurs, il a été montré que LKB1 est capable d'induire l'apoptose *in vitro* et *in vivo*. Le suppresseur de tumeur p53 a été proposé comme médiateur de l'apoptose induite par LKB1 (Karuman et al. 2001). En outre, LKB1 et ses homologues sont impliquées dans la régulation de l'établissement de la polarité et la mise en place de l'axe des organismes et/ou des organes. C'est notamment le cas dans l'ovocyte de la drosophile, les cellules intestinales en culture ou encore le zygote du nématode.

Ces différentes fonctions, et d'autres non décrites dans le manuscrit, conduisent à considérer LKB1 comme appartenant à la famille des suppresseurs de tumeur.

#### **4. Quelques cibles de PAR-4/LKB1**

##### **a. La protéine kinase PAR-1/MARK est un effecteur majeur de PAR-4/LKB1**

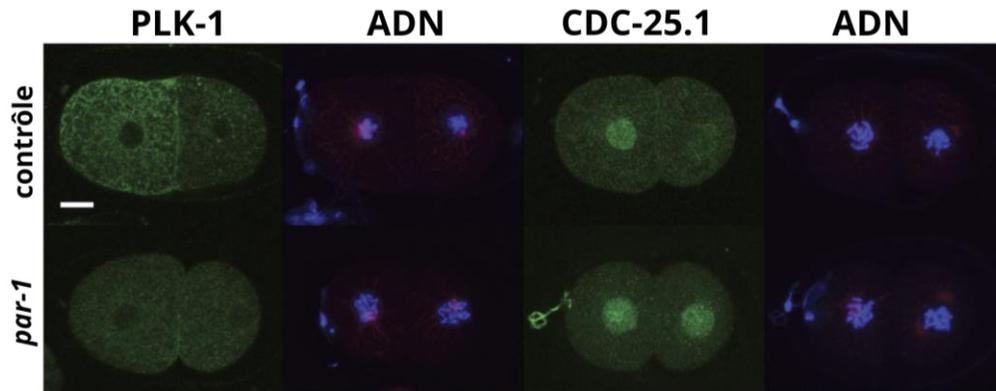
Il a été montré que LKB1 est capable de phosphoryler *in vitro* AMPK et 11 autres protéines kinases de la même famille que AMPK (Lizcano et al. 2004). Parmi celles-ci, LKB1 phosphoryle les protéines MARK1-4. La famille MARK est très étudiée, notamment pour ses divers rôles dans la régulation de la polarité cellulaire et son interaction avec les microtubules.

Dans les cellules humaines en culture, la protéine sérine-thréonine kinase MARK3 est phosphorylée par LKB1 (Lizcano et al. 2004; Spicer et al. 2003). Activée par LKB1, MARK3 est capable d'activer Dishevelled, un composant de la voie Wnt (Spicer et al. 2003). Les protéines Par-1 et PAR-1 sont les homologues de MARK3 chez la drosophile et *C. elegans* respectivement (Doerflinger et al. 2003; Guo and Kemphues 1995).

Chez la drosophile, il a été montré que LKB1 phosphoryle *in vivo* Par-1 au niveau de sa boucle d'activation dans le domaine kinase (Wang, Imai, and Lu 2007). De plus, la polarité de l'ovocyte de drosophile est perturbée de façon similaire dans les mutants *par-4* et *par-1* (Martin and St Johnston 2003). Dans ce système, il a été proposé que Par-1 est activée par LKB1 et interagit ensuite avec les microtubules pour promouvoir l'établissement de l'axe antéro-postérieur via la ségrégation des transcrits maternels (Martin and St Johnston 2003). En outre, dans l'œil de drosophile, la déplétion de Par-1 entraîne un

phénotype similaire à la déplétion de LKB1 en induisant des défauts de remodelage de la polarité ainsi que la présence de jonctions adhérentes plus longues (Amin et al. 2009). Par-1 agit sur la protéine Tau qui interagit avec le cytosquelette de microtubules afin de permettre la localisation polarisée des protéines apicales et basales lors de la morphogenèse de l'œil (Nam 2016). Toutefois, le phénotype des clones mutants *Par-1* reste plus faible que celui des clones mutants *lkb1* (Amin et al. 2009).

Chez *C. elegans*, comme PAR-4, PAR-1 régule la dynamique de la réplication de l'ADN au cours de la division asynchrone de l'embryon 2-cellules (Benkemoun et al. 2014). En outre, PAR-1 contrôle également l'enrichissement asymétrique de PLK-1 et CDC-25.1 afin de réguler le temps de division du blastomère P1 au stade 2-cellules (**fig. 54**) (Rivers et al. 2008). De façon similaire aux embryons mutants *par-4*, les embryons *par-1* subissent une ségrégation anormale de nombreux facteurs maternels lors de l'embryogénèse précoce. Ainsi, dans les mutants *par-1*, les granules P sont distribués uniformément dans les blastomères embryonnaires, alors qu'ils devraient être ségrégués spécifiquement dans le lignage de la lignée germinale (Kemphues et al. 1988). De même, MEX-3 et GLP-1 sont enrichies dans tous les blastomères embryonnaires et PAL-1 n'est pas détectée dans les embryons *par-1* comme dans les embryons *par-4* (Bowerman et al., 1997; Crittenden et al., 1997; Hunter and Kenyon, 1996). Par ailleurs, les embryons *par-1* ne présentent pas de cellules intestinales, comme c'est le cas des embryons *par-4* (Kemphues et al., 1988; Morton et al., 1992).. En revanche, au contraire des embryons *par-4* qui ne présentent pas de défaut, les embryons *par-1* montrent une stabilisation de SKN-1 dans les blastomères antérieurs au stade 4-cellules (Bowerman et al. 1993, 1997). En outre, alors que les zygotes *par-4* subissent une division asymétrique pour former une grande cellule AB et une plus petite cellule P1, les zygotes *par-1* subissent une division symétrique avec la production de cellules filles de taille similaire (Guo and Kemphues 1995; Kemphues et al. 1988).



**Figure 54 : PAR-1, comme PAR-4, régule le cycle cellulaire du blastomère P1 via PLK-1 et CDC-25.1 au stade 2-cellules.**

Immunomarquage des protéines PLK-1 et CDC-25.1 dans des embryons deux-cellules contrôle et *par-1*. Dans les embryons contrôles, PLK-1 est enrichie dans le blastomère antérieur AB et CDC-25.1 est localisé asymétriquement avec un enrichissement nucléaire dans AB. Dans les embryons *par-1*, ces deux distributions asymétriques sont perdues. Images adaptées de Rivers et al., 2008.

Chez le nématode, PAR-4 agit via PAR-1 mais également via PIG-1, une autre protéine kinase qui est un homologue de la famille MELK. PIG-1 intervient notamment dans la régulation du cytosquelette d'actomyosine par PAR-4 lors de la première division du zygote (Pacquelet et al. 2015). Par la suite, PIG-1 est impliquée dans le contrôle de la mort cellulaire par extrusion de certaines cellules (Denning et al. 2012). En revanche, contrairement aux embryons *par-4* et *par-1*, les embryons *pig-1(null)* sont viables (Denning et al. 2012; Kemphues et al. 1988). Les protéines kinase PAR-1 et PIG-1 peuvent également fonctionner au sein de voies parallèles et redondantes, par exemple dans la régulation de l'orientation de l'axe de division du blastomère EMS ou de la spécification de l'endoderme (Liro, Morton, and Rose 2018). Dans ce contexte, PAR-1 agit sur la voie de signalisation Wnt tandis que PIG-1 agit sur la voie de signalisation Src issues du blastomère P2.

### **b. Régulation de GSK3 $\beta$ par LKB1**

La protéine LKB1 régule de nombreuses voies de signalisation. Parmi celles-ci, elle contribue à contrôler la voie Wnt. Dans des cellules HeLa, l'expression de la protéine LKB1 sauvage conduit à l'activation de GSK3 $\beta$  et à la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine : la voie Wnt est alors inhibée (Lin-Marq, Borel, and Antonarakis 2005). Au contraire, l'expression de formes mutées de LKB1, avec son domaine kinase tronqué ou une localisation nucléaire permanente, n'aboutit pas à l'activation de GSK3 $\beta$ . La  $\beta$ -

caténine n'est pas phosphorylée et les gènes cibles de Wnt s'expriment alors. Ainsi, LKB1 inhibe la voie Wnt canonique en agissant sur GSK3 $\beta$  dans ce système.

Une précédente étude a mis en évidence une fonction opposée de XEEK1, l'homologue de LKB1 chez le xénope, sur la voie Wnt au cours du développement embryonnaire (Ossipova et al. 2003). La déplétion ou la perte de fonction de XEEK1 conduit à un axe du corps raccourci ainsi que de sévères défauts du développement de la tête et de la notochorde. XEEK1 est un régulateur essentiel du développement dorsoantérieur chez le xénope. Il a été montré que XEEK1 potentialise l'activation de la  $\beta$ -caténine et l'activation de l'expression des gènes cibles de la voie Wnt. En effet, le gain de fonction de XEEK1 entraîne la phosphorylation accrue de GSK3 $\beta$  au résidu Ser9 et des niveaux élevés de  $\beta$ -caténine. Au contraire, la perte de fonction de XEEK1 induit une phosphorylation diminuée de GSK3 $\beta$  au résidu Ser9 et des niveaux bas de  $\beta$ -caténine (Ossipova et al. 2003). Le résidu Ser9 est un site de phosphorylation de GSK3 $\beta$  connu pour inhiber son activité. XEEK1 ne phosphoryle pas directement GSK3 $\beta$ , mais phosphoryle la protéine kinase C- $\zeta$  (PKC- $\zeta$ ) qui phosphoryle à son tour GSK3 $\beta$  (Ossipova et al. 2003). Ainsi, XEEK1, en inhibant GSK3 $\beta$ , XEEK1 promeut la voie de signalisation Wnt canonique.

Par ailleurs, chez le rat, LKB1 exerce un rôle dans la migration neuronale (Asada and Sanada 2010). Pour cela, LKB1 médie la phosphorylation du résidu Ser9 de GSK3 $\beta$  au pôle apical des neurones. Cette phosphorylation de GSK3 $\beta$  est requise pour permettre une migration neuronale normale (Asada and Sanada 2010). Dans ce système, LKB1 et GSK3 $\beta$  interagissent physiquement. L'inactivation locale de GSK3 $\beta$  par LKB1 permet l'activation de APC, une protéine reliant les extrémités (+) des microtubules (Asada and Sanada 2010). Au contraire, lorsqu'elle est active, GSK3 $\beta$  phosphoryle APC et empêche son interaction avec les microtubules. Ainsi, LKB1 inhibe GSK3 $\beta$  localement pour promouvoir la migration cellulaire des neurones chez le rat via APC.

Les protéines Par-1 et GSK3 $\beta$  ont été montrées comme interagissant au sein de la voie de signalisation chez la drosophile notamment. Dans deux modèles distincts, Par-1 effectue une phosphorylation primaire sur un substrat de GSK3 $\beta$ , permettant ainsi l'action de GSK3 $\beta$  (Morais-de-Sá et al. 2013; Nishimura, Yang, and Lu 2004). Ainsi, dans l'œil de la drosophile, Par-1 phosphoryle la protéine Tau ; cette dernière est alors phosphorylée par GSK3 $\beta$  (Nishimura et al. 2004). Cette voie de signalisation régule la morphogenèse de l'œil. Par ailleurs, dans l'ovocyte de la drosophile, Par-1 effectue une phosphorylation primaire de la protéine Oskar, permettant sa seconde phosphorylation par GSK3 $\beta$  (Morais-de-Sá et al. 2013). Cette cascade de signalisation aboutit à la formation d'un phosphodégren et

cible Oskar pour une dégradation. Cette fonction est essentielle pour établir un axe antéro-postérieur correct dans l'ovocyte.

## V. Objectif de la thèse

Dans cet état de l'art, j'ai présenté les multiples fonctions des protéines PAR-4/LKB1 dans ces processus biologiques divers telles que la régulation de la polarité cellulaire, du cycle cellulaire ou encore de la prolifération et de l'apoptose. Chez l'être humain, les mutations de *lkb1* sont responsables du syndrome de Peutz-Jeghers.

L'objectif de ma thèse était de disséquer les fonctions de la protéine PAR-4 *in vivo* en utilisant comme modèle l'intestin de l'embryon *Caenorhabditis elegans*. Pour cela, j'ai utilisé une approche de perte de fonction via la souche thermosensible nommée *par-4(it47)*, porteuse d'une mutation ponctuelle au sein du domaine kinase. Grâce à une combinaison d'observations en microscopie confocale à fluorescence ainsi que d'une analyse en MET effectuée par Ophélie Nicolle, j'ai testé l'implication de PAR-4 dans le développement de l'intestin du nématode, depuis la polarisation épithéliale des cellules intestinales et la formation de la bordure en brosse jusqu'aux étapes précoces de spécification des blastomères embryonnaires.

# Résultats

## I. Article scientifique

**“PAR-4/LKB1 regulates intestinal cell number by restricting endoderm specification to the E lineage”**

doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.12.511872>

# **PAR-4/LKB1 regulates intestinal cell number by restricting endoderm specification to the E lineage**

**Running title: PAR-4/LKB1 regulates intestinal specification in *C. elegans***

## **Authors:**

Flora Demouchy<sup>1</sup>, Ophélie Nicolle<sup>1</sup>, Grégoire Michaux<sup>1,\*</sup>, Anne Pacquelet<sup>1,\*</sup>

\* Corresponding authors

## **Affiliations :**

<sup>1</sup> Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de Génétique et de Développement de Rennes), UMR 6290, F-35000 Rennes, France

## **Contact information:**

anne.pacquelet@univ-rennes1.fr

gregoire.michaux@univ-rennes1.fr

CNRS UMR6290 - IGDR

CNRS UMR6290 - IGDR

2 avenue du Professeur Léon Bernard

2 avenue du Professeur Léon Bernard

35043 Rennes Cedex

35043 Rennes Cedex

France

France

## Abstract

The master kinase PAR-4/LKB1 appears as a major regulator of intestinal physiology. It is in particular mutated in the Peutz-Jeghers syndrome, an inherited disorder in which patients develop benign intestine polyps. Moreover, ectopic activation of PAR-4/LKB1 is sufficient to induce the polarized accumulation of apical and basolateral surface proteins and the formation of apical microvilli-like structures in intestinal epithelial cancer cell lines. In *C. elegans*, PAR-4 was shown to be required for the differentiation of intestinal cells. Here, we further examine the role of PAR-4 during intestinal development. We find that it is not required for the establishment of enterocyte polarity and plays only a minor role in brush border formation. By contrast, *par-4* mutants display severe deformations of the intestinal lumen as well as supernumerary intestinal cells, thereby revealing a novel function of PAR-4 in preventing intestinal hyperplasia. Importantly, we find that the ability of PAR-4 to control intestinal cell number does not involve the regulation of cell proliferation but is rather due to its ability to restrict the expression of intestinal cell fate factors to the E blastomere lineage. We therefore propose that PAR-4 is required to regulate *C. elegans* intestine specification.

## Introduction

The master kinase PAR-4/LKB1 is a notorious tumour suppressor, mutated in sporadic cancers as well as in the Peutz-Jeghers syndrome, an inherited disorder in which patients develop benign intestine hamartomatous polyps and a high frequency of malignant tumours (Alessi et al., 2006; Partanen et al., 2013). The exact origin of the intestinal polyps observed in the Peutz-Jeghers syndrome is not clear but may be linked to the function of LKB1 in intestinal stromal cells. Indeed, tissue-specific deletions of LKB1 in mice have shown that the loss of LKB1 in the sole intestinal epithelial cells does not induce polyp formation while LKB1 deletion in stromal cells, namely smooth muscle cells, fibroblasts and immune T cells, gives rise to polyposis (Katajisto et al., 2008; Ollila et al., 2018; Poffenberger et al., 2018). Abnormal production of interleukins in LKB1 deficient stromal cells may lead to increased JAK/STAT3 signalling and thereby to hyperproliferation of epithelial cells (Ollila et al., 2018;

Poffenberger et al., 2018). Besides its role in preventing the formation of intestinal polyps, LKB1 has also been proposed to regulate intestinal polarity and brush border formation. In intestinal epithelial cancer cell lines, ectopic activation of PAR-4/LKB1 is sufficient to induce the polarized accumulation of typical apical and basolateral surface proteins and the formation of apical microvilli-like structures (Baas et al., 2004). It should however be noted that deletion of the LKB1 kinase domain in mouse intestinal cells does not seem to affect epithelial polarity (Shorning et al., 2009). Thus, although LKB1 appears as a major regulator of intestinal physiology, its exact *in vivo* functions remain to be elucidated. To further decipher the role of PAR-4/LKB1 during intestinal development, we took advantage of the *C. elegans* intestine. This very simple intestine constitutes an ideal model to characterize *in vivo* the different steps of intestinal development, including specification and differentiation, proliferation, polarization and formation of a brush border. The *C. elegans* intestine is composed of 20 cells, which form an antero-posterior tube surrounding the intestinal lumen. These 20 intestinal cells all derive from a single embryonic precursor cell, the E blastomere, which is born on the surface of the embryo at the 8-cell embryonic stage (Leung et al., 1999; Sulston et al., 1983). The two daughters of the E blastomere then migrate inside the embryo at the beginning of gastrulation, and undergo a series of stereotyped cell divisions, which give rise to the 20-cell stage intestine (Asan et al., 2016; Leung et al., 1999). The different intestinal development stages are named according to the number of E descendants present (E2, E4, E8, E16 and E20). Cell polarization occurs at the E16 stage (Achilleos et al., 2010; Leung et al., 1999; Totong et al., 2007). Shortly after, small gaps start to separate intestinal cells at the midline to eventually form the intestinal lumen (Asan et al., 2016; Bidaud-Meynard et al., 2021; Leung et al., 1999). Microvilli start to appear at the E20 stage, during the 1.5-fold embryonic developmental stage and form a regular brush border between the 2 and 3-fold stages (Asan et al., 2016; Bidaud-Meynard et al., 2021).

In 4-cell stage embryos, asymmetric cell division of the EMS cell gives rise to the E and MS blastomeres. The restricted expression of two GATA transcription factors, END-1 and END-3, in the E blastomere induces intestinal fate specification (Maduro et al., 2005a; Zhu et al., 1997, 1998) and expression of

the differentiation GATA factors ELT-2 and ELT-7 (Fukushige et al., 1998; Maduro et al., 2005a; Sommermann et al., 2010; Wiesenfahrt et al., 2016; Zhu et al., 1998). *end-1* and *end-3* expression is induced by two other GATA factors, MED-1 and MED-2, which are themselves controlled by the bZIP-like factor SKN-1 (Maduro et al., 2005b, 2001). 50 to 80 % of embryos lacking SKN-1 or MED-1/2 do not form intestinal cells, reflecting the crucial role of the SKN-1 / MED-1/2 pathway for intestinal specification (Bowerman et al., 1992; Maduro et al., 2005b, 2001). However, the persistence of intestinal cells in a small percentage of these embryos also reveals the existence of parallel pathways, which can trigger intestinal specification. Consistently, further studies have shown that both the transcription factors POP-1/TCF and PAL-1 can also induce *end-1* and *end-3* expression in the E lineage (Maduro et al., 2005b). Moreover, while SKN-1 and MED-1/2 are expressed both in the E and MS blastomeres, their ability to induce *end-1* and *end-3* transcription is repressed in the MS cell. This repression is due to the strong nuclear accumulation of POP-1/TCF in the MS cell (Calvo et al., 2001; Lin et al., 1995; Maduro et al., 2005b; Shetty et al., 2005). In the E blastomere, Wnt signaling emanating from the P2 cell reduces the nuclear accumulation of POP-1/TCF, converts it to a transcription activator and allows both SKN-1 and POP-1 dependent *end-1* and *end-3* expression (Lin et al., 1995; Maduro et al., 2005b; Rocheleau et al., 1997; Shetty et al., 2005; Thorpe et al., 1997).

In *C. elegans*, PAR-4 plays a crucial role in the asymmetric localization of cell fate determinants in the early embryo (Kemphues et al., 1988; Tenlen et al., 2008) and is required for the differentiation of intestinal cells (Kemphues et al., 1988; Morton et al., 1992). In the one-cell embryo, it also moderately affects cortical polarity (Chartier et al., 2011; Hung and Kemphues, 1999) and controls cell cycle timing through the regulation of both CDC-25.1 and replication origins (Benkemoun et al., 2014; Rivers et al., 2008). In this work, we examine the role of PAR-4 during intestinal development. We show that PAR-4 is not required for epithelial polarity establishment and has a minor role in brush border formation. By contrast, severe deformations of the intestinal lumen are observed in *par-4* mutants. These deformations are associated with the presence of supernumerary intestinal cells. Importantly, we find

that PAR-4 does not control on intestinal cell number by regulating cell proliferation but rather by restricting intestinal specification to the E blastomere.

## Results

### **PAR-4 is dispensable for intestinal apico-basal polarity and microvilli formation in *C. elegans***

In *C. elegans*, a faint and uniform cortical PAR-4 immunostaining has been observed in one-cell embryos. As the embryos further divide, the cortical enrichment of PAR-4 becomes more robust, in particular at cell-cell boundaries (Watts et al., 2000). To further characterize PAR-4 expression pattern, we used CRISPR/Cas9 genome editing to endogenously label the two longest PAR-4 isoforms with the monomeric Neon Green (mNG) fluorophore. Consistent with a recent report (Roy et al., 2018), we observed that mNG::PAR-4 was ubiquitously expressed and cortically enriched in embryos, especially at cell-cell boundaries (Fig.1A). In enterocytes, mNG::PAR-4 localized both at the apical and basolateral cortex. During the early steps of intestine polarization, mNG::PAR-4 also localized on numerous subapical foci (Fig.1A). These foci were highly dynamic, suggesting that they may correspond to intracellular trafficking vesicles (Movie 1). Interestingly, we could distinguish two populations of foci: smaller foci moved in both directions all along lateral membranes while larger foci moved in the vicinity of the apical membrane.

This localization prompted us to ask whether PAR-4 is necessary for *in vivo* polarization and brush border formation. Intestinal polarization starts with the apical accumulation of PAR-3/PAR-6/PKC-3 at the E16 stage, preceding embryonic elongation (Achilleos et al., 2010; Totong et al., 2007). Basolateral proteins such as LET-413<sup>Scribble</sup> initially localize on all membranes before being excluded from the apical membrane at the beginning of embryonic elongation (Legouis et al., 2000; Pickett et al., 2021). Consistently, in elongated 2-fold embryos, we observed that endogenously tagged PAR-6::GFP and LET-413<sup>Scribble</sup>::mNG localized at the apical and basolateral membranes of enterocytes, respectively (Fig.1C). PAR-6::GFP already localized at the apical membrane prior to elongation, in early lima bean embryos (Fig.1B). To inactivate PAR-4 we used the *par-4(it47)* thermosensitive allele (Kemphues et al.,

1988; Watts et al., 2000) and shifted the embryos at restrictive temperature (25°C) two hours before imaging. Inactivating PAR-4 two hours before the lima bean stage, i.e. prior to the beginning of enterocyte polarization, did not alter PAR-6 apical localization (n=27) (Fig.1B). Similarly, inactivating PAR-4 two hours before the 2-fold stage, i.e during the first step of apical polarization, before the apical exclusion of LET-413<sup>Scribble</sup>, did not prevent LET-413<sup>Scribble</sup> from eventually being restricted to the basolateral membrane (n=10) (Fig.1C). Thus, PAR-4 does not seem to be required for the establishment of apico-basal polarity.

Once polarized, enterocytes assemble a regular array of microvilli which forms the brush border (Asan et al., 2016; Bidaud-Meynard et al., 2021; Leung et al., 1999). Observation of 3-4-fold embryos expressing endogenously tagged ezrin (ERM-1::mNG) and intermediate filament (IFB-2::wScarlet) by super-resolution confocal microscopy allowed us to distinguish regularly organized apical microvilli containing ezrin and the subapical terminal web (Fig.1D). Inactivating PAR-4 two hours before the 3-4-fold stage, i.e. during brush border formation, did not alter ERM-1 and IFB-2 localization and did not seem to prevent microvilli formation (n=28) (Fig.1D). To further characterize the effect of PAR-4 loss-of-function on brush border formation, we used transmission electron microscopy (TEM). At the 3 to 4-fold stage, control embryos displayed regular microvilli at the apical membrane of enterocytes (Fig.1E). Consistent with our super-resolution observations, we found that *par-4(it47ts)* embryos also developed an apical brush border (Fig.1E). Nonetheless, measurements of microvilli features, i.e their density, length and width, revealed mild defects of the brush border ultrastructure. Namely, microvilli density was slightly decreased while microvilli were slightly longer and thinner in *par-4(it47ts)* embryos compared to controls (Fig.1F). It should however be mentioned that our analysis also revealed rather strong inter-individual variations (Fig.S1A-C). Altogether, our observations demonstrate that PAR-4 is not required for intestinal cell polarity and has a rather minor role in microvilli formation in *C. elegans* embryos.

## PAR-4 regulates lumen architecture and intestinal cell number

While *par-4(it47)* embryos do not have strong polarity or brush border defects, we found that they displayed striking lumen deformations. In contrast with control embryos, which had a regular elliptical intestinal lumen, *par-4(it47)* mutant embryos exhibited severe deformations of the apical membrane (Fig.2A-B). At the 3-4-fold stage, such deformations were visible in 28% (n = 16/57) and 78% (n = 7/9) of *par-4(it47ts)* embryos observed either by confocal or transmission electron microscopy (TEM), respectively. Notably these defects were not observed in 2-fold embryos (n=20) (Fig.S2A). Importantly, we noticed that ERM-1 and IFB-2 correctly localized even in regions with strong lumen deformations (n=28) (Fig.S2B), thus confirming that apical membrane deformations are not linked to defects in apical polarity.

We next wondered whether these lumen deformations were associated with other defects in tissue organization and first examined apical junctions. *C. elegans* enterocytes have only one type of apical junction, the *C. elegans* apical junction (CeAJ), which is formed by two protein complexes, the cadherin/catenin complex (CCC) and the DLG-1/AJM-1 complex (DAC) (McMahon et al., 2001; Segbert et al., 2004). The CCC is composed of HMR-1, HMP-1 and HMP-2, the homologs of classical E-cadherin,  $\alpha$ -catenin and  $\beta$ -catenin, respectively (Costa et al., 1998). The DAC localizes basally to the CCC and contains DLG-1, the homolog of Disc large (McMahon et al., 2001) and the non-conserved protein AJM-1 (Köppen et al., 2001). To test whether PAR-4 loss-of-function had an effect on intestinal CeAJs, we used strains expressing the endogenously tagged CeAJ components DLG-1::mNG, HMR-1::GFP or HMR-1::mKate2 and HMP-1::GFP (Heppert et al., 2018; Marston et al., 2016). DLG-1, HMR-1 and HMP-1 localized at CeAJs, both in control and *par-4(it47)* embryos (Fig.2C and S2C). However, additional CeAJs were visible in about one third of *par-4(it47)* embryos (Fig.2C, Fig.S2C-D). Contrary to lumen deformations, these supernumerary CeAJs were present both in 2-fold and 3-4-fold embryos (Fig.S2D). We next used TEM to complete our analysis. The *C. elegans* gut arranges into rings composed of two enterocytes, except the anterior ring, which is made of four cells. Thus, on TEM transversal sections, control embryos display two, occasionally four, electron dense structures corresponding to CeAJs,

which maintain the cohesion between the two, or four, cells surrounding the lumen (Fig.2B). By contrast, more than two CeAJs were observed on several sections of all *par-4(it47)* embryos and sections with more than four CeAJs were found in 56% of *par-4(it47)* embryo (n = 5/9) (Fig.2B). Notably, we also found that junction length increased in all *par-4(it47)* embryos analyzed by TEM (n = 9) (Fig.S2E).

The presence of additional CeAJs prompted us to examine the number of intestinal cells present in *par-4(it47)* mutants. To this end, we used strains expressing an intestinal-specific nuclear marker, expressed under the control of the *elt-2* promoter, *elt-2p::NLS::GFP::LacZ* (Fukushige et al., 1998). While most control 2-fold embryos had 20 intestinal cells, 32% of *par-4(it47)* embryos (n = 10/31) had 25 or more enterocytes (Fig.2D), indicating that PAR-4 prevents the appearance of supernumerary intestinal cells. These observations were initially made after shifting *par-4(it47)* embryos two hours at restrictive temperature (25°C). We next wondered whether the timing of temperature shift could influence the number of intestinal cells. First, we counted intestinal cells in *par-4(it47)* embryos, which had been kept at permissive temperature (15°C) before observation and surprisingly found that 27% (n = 9/33) had an excess of enterocytes (Fig.S2F). This result could be explained by previous observations showing that the *par-4(it47)* allele is already partially inactivated at 15°C (Morton et al., 1992). However, the similarity between the phenotypes observed at 15°C or after two hours at 25°C also suggested that the presence of supernumerary cells was not due to the inactivation of PAR-4 in the two hours preceding the 2-fold stage but rather to an earlier effect of PAR-4. To test this hypothesis, we next tried to observe intestinal cells in *par-4(it47)* embryos after a longer shift at 25°C. Unfortunately, under those conditions, the *par-4(it47)* mutation induced pleiotropic embryonic defects, in particular an elongation arrest, precluding proper embryo staging and characterization.

### **Lumen defects in *par-4* mutants are due do the presence of additional intestinal cells**

Our observations revealed the existence of different gut phenotypes in *par-4(it47)* embryos: mild brush border defects, increased junction length, intestinal lumen deformations, additional apical junctions and excess of enterocytes. We wondered whether these phenotypes were due to a unique

function or to several roles of PAR-4. We first asked whether the presence of supernumerary enterocytes could affect tissue organization and lead to the appearance of additional CeAJs and lumen deformations. To this end we observed embryos co-expressing an intestinal nuclear marker and the CeAJ marker HMR-1::mKate2 and found that 23% of *par-4(it47ts)* 2-fold embryos (n = 7/31) had extra intestinal nuclei. Importantly, all of them also displayed additional CeAJs (Fig.3A). Reciprocally, all embryos with additional CeAJs (n = 7/31) also had supernumerary intestinal cells. Moreover, observation of embryos co-expressing HMR-1::mKate2 and ERM-1::mNG showed that 61% of *par-4(it47)* 3-4-fold embryos (n = 25/41) displayed intestinal lumen deformations and 92% of those embryos (n = 23/25) also had additional CeAJs (Fig.3B). Reciprocally, 63% of *par-4(it47)* had additional CeAJs (n = 26/41) and 89% of them (n = 23/26) displayed lumen deformations. Similarly, the presence of additional CeAJs was associated with the presence of lumen deformations on TEM images (Fig.2B). We next used a plasma membrane marker specifically expressed in the intestine, *vha-6p::PH::GFP*, to be able to assess both lumen and enterocyte organization. In control 3-4-fold embryos, *vha-6p::PH::GFP* allowed us to distinguish the regular and elliptical shape of the lumen and the presence of two enterocytes in the ring surrounding the lumen (Fig.3C). By contrast, 18% of *par-4(it47)* embryos (n = 7/38) displayed intestinal lumen deformations (Fig.3C). Notably, all of them (n = 7/7) also had additional enterocytes surrounding the lumen (Fig.3C). Finally, our TEM analysis revealed the presence of more than 4 cells per intestinal ring on sections from 56 % of *par-4(it47)* embryos (n = 5/9). In all those cases, the lumen appeared deformed and additional CeAJs were observed (Fig.3D). Altogether, our observations reveal a strong correlation between the presence of extra intestinal cells, additional CeAJs and lumen deformation, suggesting that the presence of extra-intestinal cells could explain the presence of additional CeAJs and lumen deformations. By contrast, our TEM analysis did not reveal any obvious link between microvilli or CeAJs length defects and the number of additional CeAJs (Fig.S1A-C, S2E), suggesting that those latter defects may not be due to the presence of supernumerary enterocytes.

### ***cdc-25.1(gof)* mutants also display defects in lumen architecture**

In order to confirm that the presence of extra intestinal cells is responsible for the presence of additional junctions and lumen deformations, we compared the different phenotypes of *par-4(it47)* embryos with those of *cdc-25.1* gain-of-function mutant embryos. Previous studies had indeed revealed the presence of supernumerary enterocytes in *cdc-25.1(rr31)* and *cdc-25.1(ij48)* gain-of-function mutants (Clucas et al., 2002; Kostić and Roy, 2002). Immunostaining of the junction component AJM-1 also suggested the presence of additional CeAJs in the intestine of *cdc-25.1(ij48)* embryos (Clucas et al., 2002). We first observed *cdc-25.1(rr31)* gain-of-function mutants co-expressing an intestinal nuclear marker and the CeAJ marker HMR-1::mKate2 and confirmed that all *cdc-25.1(rr31)* embryos had supernumerary enterocytes and additional CeAJs (n = 15) (Fig.S3A). We next characterized the lumen morphology of *cdc-25.1(rr31)* embryos expressing *vha-6p::PH::GFP* and observed that all of them (n = 18) displayed intestinal lumen deformations (Fig.4A). Similarly, TEM sections with more than four CeAJs and severe lumen deformations were observed in all analyzed *cdc-25.1(rr31)* embryos (n = 7) (Fig.4B). Consistent with previous observations (Choi et al., 2017), we found that additional enterocytes could be organized into rings composed of four (Fig.4A) or more cells (Fig.4B). Our TEM analysis also revealed that *cdc-25.1(rr31)* mutants displayed a slightly increased microvilli density and thicker microvilli while microvilli length and CeAJs length were not affected (Fig.S3B-D). Thus, while *par-4(it47)* and *cdc-25.1(rr31)* embryos share the same phenotypes in terms of lumen and junction organization, they do not show the same microvilli and junction length defects. Altogether, these observations are consistent with our hypothesis that additional junctions and lumen deformations are linked to the presence of extra intestinal cells but suggest that the defects of microvilli and CeAJs length observed in *par-4(it47)* mutant embryos are due to separate PAR-4 functions.

### **PAR-4 does not regulate cell proliferation in the E lineage**

We next aimed at deciphering the mechanisms by which PAR-4 regulate intestinal cell number and first asked whether the supernumerary enterocytes observed in *par-4(it47)* embryos were due to

additional divisions in the E lineage. In control embryos, the 20 enterocytes all emanate from the E blastomere, which undergoes 5 series of stereotyped divisions (Fig.5A) (Leung et al., 1999; Sulston et al., 1983). Acceleration of the cell cycle, as for instance reported in *cdc-25.1* gain-of-function mutant embryos, can lead to the appearance of an extra-round of divisions and supernumerary intestinal cells (Clucas et al., 2002; Kostić and Roy, 2002). We thus performed lineage experiments to determine whether PAR-4 also regulates the duration and number of intestinal cell divisions. To follow divisions, we used strains co-expressing two gut-specific nuclear markers expressed under the *end-1* or *elt-2* promoters, *end-1p::GFP::H2B* and *elt-2p::NLS::GFP::LacZ* (Fukushige et al., 1998; Shetty et al., 2005). The *end-1* promoter-driven endodermal reporter becomes visible in E2 cells before gastrulation whereas the *elt-2* promoter-driven intestinal marker appears during the E8 stage and persists afterwards (Fig.5B). In control embryos recorded at 25°C, it took around 3 hours between the appearance of the *end-1* promoter-driven signal in E2 cells and the E16 stage (Fig.5B, n = 13). Moreover, the transitions between E2 and E4, E4 and E8, and E8 and E16 stages took in average 36 (SD ± 3 min), 58 (SD ± 9 min) and 143 (SD ± 21 min) minutes, respectively (n = 13) (Fig.5C). As previously reported (Kostić and Roy, 2002), we found that intestinal cells divided faster in *cdc-25.1(rr31)* gain-of-function embryos: the transitions between E2 and E4, E4 and E8, and E8 and E16 stages took in average 28 (± SD 3 min), 29 (SD ± 3 min) and 100 (SD ± 37 min) minutes, respectively (n = 16) (Fig.5B-C). As a result, E descendants underwent an additional division and, after 3h at 25°C, the intestine was composed of 32 cells (Fig.5B). By contrast, no extra-division occurred in the E lineage of *par-4(it47)* embryos observed during 3h at 25°C (Fig.5B). Consistently, we did not observe any acceleration of the cell cycle as the transitions between E2 and E4, E4 and E8, and E8 and E16 took in average 38 (SD ± 6 min), 72 (SD ± 14 min) and 150 (SD ± 29 min) minutes, respectively (n = 19) (Fig.5C). Thus, unlike what happens in *cdc-25.1* gain-of-function mutants, the supernumerary intestinal cells observed *par-4(it47)* mutants do not result from an overall shortening of the E lineage cell cycles and from the appearance of an extra division between the E2 and E16 stage.

Once embryos have reached the E16 stage, only four enterocytes of the E16 intestinal primordium, referred to as “star cells”, divide to obtain the final E20 stage (Sallee et al., 2021). These “star cells” usually divide between the late lima bean and the 1.8-fold stages ((Sallee et al., 2021) and our observations). During our long-lasting lineage experiments, we however failed to record this late division, including in control embryos. This prevented us from determining whether the extra intestinal cells observed in *par-4(it47)* mutants could result from the late and abnormal division of non “star-cells”. To circumvent this technical problem, we first imaged control and *par-4(it47)* embryos which were at the lima bean stage and had 16 intestinal nuclei. We next observed the same embryos between one and two hours later: at this time point, control embryos had mostly 20 intestinal cells (n = 15/18), occasionally 21 (n = 3/18) (Fig.5D). Similarly, *par-4(it47)* embryos mainly exhibited 20 intestinal nuclei (n = 32/37), occasionally 19 (n = 1/37), 21 (3/37) or 22 (1/37) (Fig.5D). They thus had normally completed their last intestinal cell division and did not undergo another round of division. Altogether, our results thus show that the presence of supernumerary intestinal cells in *par-4(it47)* mutants is not due to excessive cell proliferation in the E lineage. Surprisingly, we also observed that the intestine-specific degradation of PAR-4 did not affect intestinal cell number (Fig.S4A-B), suggesting that the presence of supernumerary intestinal cells in *par-4(it47)* mutants is not due the inactivation of PAR-4 in the E lineage but rather reveals a novel function of PAR-4 outside the E lineage.

#### **PAR-4 regulates intestinal cell number by restricting intestinal specification to the E lineage**

While our lineage experiments showed that the descendants of the E blastomere divide normally in *par-4(it47)* embryos, we occasionally observed the expression of the *end-1* promoter-driven reporter in two cells outside the E lineage (n = 2/19). This ectopic expression of the *end-1* marker suggested that some cells that are not emanating from the E lineage adopt an intestinal-like fate and produce extra enterocytes. In these first lineage experiments, embryos were shifted at 25° just before imaging (see Table S2). We next tested whether an earlier shift would lead to the more frequent ectopic expression of the *end-1* marker and shifted the embryos at 25°C one hour before imaging. Under these conditions, we found that 53% of *par-4(it47)* embryos (n = 19/36) ectopically expressed *the end-*

1 reporter in one or two cells localized outside the E lineage (Fig.6A). This ectopic expression appeared at the E2 stage or when Ea and Ep divide (Fig.6A). Importantly, we found that the presence of these cells ectopically expressing *end-1* does not decrease cell cycle length in the E lineage (Fig.6B).

According to their position within the embryo, most of E-like cells expressing *end-1* in *par-4(it47)* embryos seem to arise from the C lineage (Fig.6A). With the help of the brightfield channel we could follow cell lineages and unambiguously identify the origin of these E-like cells in 17 embryos. We found that the *end-1* reporter was mainly expressed in the posterior daughter of the C blastomere, called Cp, or its descendants, Cpa and Cpp (n = 15/17) (Fig.6A,C, Fig.S5) and occasionally both in Ca and Cp (2/17). In 3/17 embryos, the *end-1* reporter was expressed both in the C lineage and in the MSp lineage (Fig.6F). To confirm these results, we followed embryonic cell divisions by imaging embryos co-expressing the *end-1* reporter and a ubiquitously expressed membrane marker (Fig.6D). In this experiment, 47% of *par-4(it47)* embryos (n = 14/30) showed ectopic expression of the *end-1* marker. This mostly occurred within the C lineage (n = 10/14), especially in Cp or its descendants Cpa and Cpp (n = 9/10) and occasionally both in Ca and Cp (n = 1/10). In a few embryos (n = 4/14), the *end-1* marker was expressed only in MSp descendants. Our data thus suggests that PAR-4 restricts intestinal specification to the E lineage by preventing *end-1* expression in the C and MS blastomeres.

We then wondered whether the ectopic expression of *end-1* in cells localized outside the E lineage is sufficient to induce intestinal differentiation in those cells. To address this question, we analyzed the expression of the *elt-2*-promoter driven reporter in *par-4(it47)* embryos displaying ectopic *end-1* expression. All control embryos (n = 6), as well as all *par-4(it47)* embryos without *end-1* ectopic expression (n = 17), expressed the *elt-2* reporter in all E descendants (Fig.6E). Among the *par-4(it47)* embryos ectopically expressing *end-1* in the C lineage, 65% (n=11/17) also expressed the *elt-2* reporter in at least some descendants of the C lineage. The number of C descendants expressing the *elt-2* reporter was variable, ranging from no cell to all cells ectopically expressing *end-1* (Fig.6F-I). Notably, in those embryos, there was also substantial variability in the number of E descendants expressing *elt-2* (Fig.6F-I). Unlike the C lineage, the descendants of MSp ectopically expressing the *end-1* marker

never turned on the *elt-2* signal (Fig.6F). This high variability in the expression of the *elt-2* reporter may be due to a more variable *end-1* expression in *par-4(it47)* embryos, both inside and outside the E lineage.

Altogether, our observations demonstrate that PAR-4 regulates the number of enterocytes without controlling cell proliferation in the E lineage but rather by preventing the C blastomere from adopting an intestinal fate. When PAR-4 is inactivated, *end-1* is ectopically expressed in the C lineage where it is sufficient to induce the ectopic expression of *elt-2*, thereby leading to the differentiation of supernumerary intestinal cells.

## **Discussion**

In this paper, we have shown that PAR-4 is not required for the establishment of apico-basal polarity during *C. elegans* intestinal development and has a minor role during brush border formation. By contrast, PAR-4 is essential to prevent intestinal hyperplasia. PAR-4 inactivation indeed results in the presence of supernumerary intestinal cells and severe lumen deformations. This novel function of PAR-4 appears to be independent from cell proliferation regulation and involves restriction of intestinal specification to the E lineage.

Our endogenously expressed mNG::PAR-4 construct confirms that PAR-4 is ubiquitously expressed in *C. elegans* embryos (Roy et al., 2018; Watts et al., 2000). It is enriched at the cell cortex, especially at cell-cell boundaries. As previously described (Watts et al., 2000), it is not polarized along the antero-posterior axis in early embryos. It also localizes to both the apical and lateral membranes in the intestinal epithelium. Besides its cortical localization, PAR-4 also localizes to dynamic foci in polarizing enterocytes. Our observations suggest the existence of two types of PAR-4 foci, small ones, which move along the lateral membranes and larger ones close to the apical membrane. Whether these two populations of PAR-4-positive foci have distinct functions and are associated with different types of trafficking vesicles remains to be determined.

Despite its intriguing dynamic localization in polarizing enterocytes, PAR-4 appears not to be required for the establishment of intestinal apico-basal polarity in *C. elegans*. We can not exclude that PAR-4 plays a minor, redundant role during polarization but it is clearly not an essential player in that process. Our results contrast with studies showing that ectopic activation of LKB1 is sufficient to establish polarity in isolated intestinal cancer cells (Baas et al., 2004). They are however consistent with the absence of obvious polarity defects in mice intestinal cells lacking LKB1 activity (Shorning et al., 2009). PAR-4/LKB1 has been shown to modulate the asymmetric localization of PAR-3, PAR-6 and aPKC in several other *in vivo* systems, including in epithelial cells (e.g. (Amin et al., 2009; Bonaccorsi et al., 2007; Chartier et al., 2011; Lee et al., 2007; Martin and St Johnston, 2003)). Many cell types can nevertheless apparently polarize normally in its absence (e.g. (Amin et al., 2009; Krawchuk et al., 2015), underlining that PAR-4/LKB1 is far from systematically having a crucial role in polarity establishment. Its requirement appears to be extremely sensitive to the cell context and may depend on the robustness of other polarization mechanisms at play in each cell type.

Our results show that PAR-4 is not strictly required for microvilli formation in *C. elegans* embryos but contributes to the formation of very typical microvilli. In intestinal cell lines, ectopic activation of LKB1 triggers the formation of microvilli-like structures through the activation of a signalling cascade involving the small GTPase Rap2 and ezrin phosphorylation (Baas et al., 2004; Gloerich et al., 2012; ten Klooster et al., 2009). In *C. elegans*, ERM-1 phosphorylation prevents the basolateral accumulation of ERM-1 in embryonic intestinal cells (Ramalho et al., 2020). The normal apical localization of ERM-1 that we observed in *par-4* embryos thus strongly suggests that ERM-1 phosphorylation is not affected in this context. Moreover, our TEM observations did not reveal microvilli defects in *rap-2(gk11)* mutant larvae (O. Nicolle, unpublished observations). It is thus unlikely that PAR-4 regulates microvilli growth through the RAP-2/ERM-1 pathway in *C. elegans*.

Besides its effect on microvilli morphology, we find that PAR-4 regulates CeAJ length. Interestingly, drosophila *lkb1(-)* photoreceptor cells also exhibit longer adherens junctions (Amin et al., 2009). Those are also frequently fragmented, a phenotype that we did not observe in the intestine of *par-4* *C.*

*C. elegans* mutants. In *C. elegans*, LET-413<sup>Scribble</sup> has been proposed to trigger CeAJs compaction and *let-413* mutants display extended and fragmented intestinal CeAJs (Legouis et al., 2000; McMahon et al., 2001). The longer CeAJs observed in *par-4(it47)* embryos could therefore in principle result from reduced LET-413 activity. However, loss of LET-413 also results in the strong mislocalization of the apical proteins PAR-3 and PAR-6 (McMahon et al., 2001). The absence of polarity defects in *par-4(it47)* embryos argues against a role of PAR-4 in regulating LET-413 activity.

Intestinal hyperplasia is the most striking phenotype that we observe in *par-4* embryos. In 2-cell *C. elegans* embryos, *par-4* mutants show an acceleration of the cell cycle in the P1 blastomere (Morton et al., 1992). This effect can be explained by the ability of PAR-4 and its effector PAR-1 to inhibit CDC-25.1 nuclear accumulation as well as DNA replication in P1 (Benkemoun et al., 2014; Rivers et al., 2008). Moreover, stabilization of CDC-25.1 in the intestine leads to cell cycle acceleration and extra enterocytes divisions (Clucas et al., 2002; Kostić and Roy, 2002). However, in the intestine, *par-4* mutants exhibit neither cell cycle acceleration nor extra divisions, suggesting that PAR-4 does not regulate CDC-25.1 in that context and that intestinal hyperplasia is not linked to excessive cell proliferation.

Rather we find that supernumerary cells arise from specification defects and are due to the abnormal expression of the intestinal specification gene *end-1* in the C lineage. In control embryos, expression of *end-1* in the E blastomere is mostly activated by SKN-1 but also by POP-1/TCF and PAL-1 (Maduro et al., 2005b). In the C lineage, SKN-1 accumulation is limited by the kinase GSK-3: depletion of GSK-3 leads to SKN-1 stabilization and transformation of C descendants into E-like cells (Maduro et al., 2001; Schlesinger et al., 1999; Shirayama et al., 2006). While PAL-1 is present and activates *end-1* expression in E cells, it is expressed at higher levels in C descendants where it promotes the expression of C lineage specific genes (Baugh et al., 2005; Hunter and Kenyon, 1996). Altogether, these observations suggest that a high SKN-1/PAL-1 ratio triggers E specification, while a low SKN-1/PAL-1 ratio induces C specification (Hunter and Kenyon, 1996; Maduro et al., 2005b). Thus, the ectopic expression of *end-1* in *par-4(it47)* embryos could either result from the abnormal stabilization or activity of SKN-1 or from

the reduced expression of PAL-1 in the C lineage. Although we could not directly assess SKN-1 activity, our unpublished observations did not reveal any SKN-1 stabilization in *par-4(it47)* embryos. By contrast PAR-4 has previously been shown to be required for PAL-1 accumulation in EMS and P2 cells (Bowerman et al., 1997), suggesting that reduced PAL-1 levels could be the cause of *end-1* expression in the C lineage of *par-4(it47)* embryos.

Importantly, most C cells ectopically expressing *end-1* also in turn activate *elt-2* expression. This observation is consistent with the terminal phenotype of *par-4* embryos, which exhibit an excess of differentiated intestinal cells. The number of cells that eventually express *elt-2* is however variable. Previous studies have shown that robust *elt-2* expression relies on robust END-1 and END-3 levels and that variability of their expression leads to stochastic *elt-2* expression (Choi et al., 2017; Raj et al., 2010). It is thus likely that variations in either the levels or the timing of *end-1* expression in the C lineage of *par-4* embryos result in variable *elt-2* expression. Notably, we also observe that some E descendants did not express *elt-2* in *par-4* embryos. These results are reminiscent of previous studies showing that PAR-4 is required for the formation of differentiated intestinal cells (Kemphues et al., 1988; Morton et al., 1992). They suggest that PAR-4 does not only prevent *end-1* expression in the C lineage but may also ensure its robust expression in the E lineage.

At the time when C descendants start to express *end-1* and then *elt-2*, they are located in the vicinity of E descendants but need to rearrange and incorporate to E descendants to form a continuous intestine. As previously described in *cdc-25.1(gof)* mutants (Choi et al., 2017), supernumerary cells eventually accommodate to form rings with more than two cells surrounding the lumen. We cannot exclude that they also occasionally form additional intestinal rings. The presence of lumen deformations is linked to the presence of supernumerary enterocytes. It is nevertheless intriguing that they become apparent only at the 3-4-fold stages. One possible explanation is that this is due to the progressive and late incorporation of supernumerary cells to form intestinal rings containing more than two cells. Alternatively, supernumerary cells may already be incorporated into intestinal rings at the 2-fold stage and induce weak lumen deformations. Those small and early lumen deformations may

then be amplified and become detectable as the lumen grows. The presence of additional CeAJs in both 2 and 3-4-fold embryos support this latter hypothesis.

In conclusion, our work reveals a novel function of PAR-4 in regulating intestinal specification. While previous work showed that PAR-4 is required to induce intestinal differentiation in the E lineage, our results demonstrate that it also prevents the C blastomere from producing intestinal cells. Similarly to supernumerary cells arising from additional divisions inside the E lineage, extra intestinal cells resulting from abnormal specification have the astonishing ability to incorporate within the intestinal epithelium, eventually forming a continuous, albeit deformed, intestinal lumen.

## **Materials and Methods**

### Worm strains

Strains were grown on agar plates containing NGM growth media and seeded with *E. coli* (OP50 strain). Worms were maintained at 20°C, except strains carrying the *par-4(it47)* thermosensitive mutation, which were kept at 15°C and shifted at restrictive temperature (25°C) during the course of our experiments. The strains used in this study are listed in Table S1 and the temperature conditions used for each experiment are detailed in Table S2.

### New CRISPR strains

CRISPR-CAS9-genome edited mNG::PAR-4, PAR-4::mKate2::AID and LET-413c::mNG were generated at the “Biologie de Caenorhabditis elegans” facility (Université Lyon 1, UMS3421, Lyon, France). mNG::PAR-4 was obtained by tagging the two longest isoforms of PAR-4 (PAR-4a and PAR-4c) with mNeonGreen at their common N-terminus. PAR-4::mKate2::AID was obtained by inserting a GASGASGAS linker, mKate2 and an Auxin Inducible Degron (AID, MPKDKPAKPPAKAQVVGWPPVRSYRKNVMVSCQKSSGGPEAAAFVK) (Zhang et al., 2015) at the N-terminus of the short PAR-4 isoform (PAR-4b). This insertion also tags the two PAR-4 long isoforms (insertion after Met142 in PAR-4a and PAR-4c). LET-413c::mNG was obtained by fusing mNeonGreen to the C-terminus of the LET-413c isoform; a GASGASGAS linker was inserted between LET-413 and mNG.

### Auxin induced degradation

Intestine specific degradation of PAR-4 was induced by incubating at 20°C embryos expressing PAR-4::mKate2::AID and the auxin receptor TIR-1 under the control of the *elt-2* promoter in 5 mM IAA-AM (acetoxymethyl indole-3-acetic acid, a cell permeable form of auxin which is able to trigger degradation in embryos, (Negishi et al., 2019)). Control experiments showed that PAR-4 was absent from intestinal cells after 1h15 auxin treatment. The number of intestinal cells in embryos depleted of PAR-4 was assessed after 6h auxin treatment.

### Microscopy and time-lapse recordings

For standard and superresolution confocal microscopy, embryos were mounted on 2% agarose pads in a drop of M9 medium. Standard confocal images were acquired with a SP8 confocal microscope (Leica) equipped with a HC Plan-Apo 63×, 1.4 NA objective and the LAS AF software. Z-stacks were acquired with 400 nm steps. Superresolution images were acquired with a LSM 880 microscope (Zeiss), equipped with a Plan-Apo 63×, 1.4 NA objective and the Zen Black software. The Airy Scan module was used to obtain superresolution images. Z-stacks were acquired with 180 nm steps (optimal step size).

For lineage experiments, adult hermaphrodites were dissected in M9 medium. Embryos were then transferred to a 4 µL drop of M9 medium on a 35 mm glass bottom dish (poly-D-lysine coated, 14 mm microwell, No 1.5 coverglass, MatTek). Excess of M9 was then removed to ensure adhesion of embryos to poly-D-Lysine and 2 mL of mineral oil (Light Oil (neat), Sigma) was used to cover the drop of M9. Recordings were performed on a Leica DMI8 spinning disc microscope equipped with a HCX Plan-Apo 63×, 1.4 NA objective and a Roper Evolve EMCCD camera. The setup was controlled by the Inscoper Imaging Suite. Embryos were maintained at 25°C during recordings. Images were acquired at 3 or 5 minutes intervals (Fig.5B and Fig.6D) or every 5 minutes during the first two hours of recordings and then every 10 minutes (Fig.6A,E-H, Fig.S5). Z-stacks were acquired with 400 nm steps.

Temperature conditions used for each experiment are detailed in Table S2.

### Transmission electron microscopy

Control and mutant *C. elegans* embryos (at 3-4 fold stage) were shifted at 25°C two hours before fixation. They were fixed by high pressure freezing with the EMPACT-2 system (Leica Microsystems). Cryosubstitution (FS) was done in anhydrous acetone containing 1% OsO<sub>4</sub>, 0.5% glutaraldehyde and 0.25% uranyl acetate for 60 h in an FS system (AFS-2; Leica Microsystems). The embryos were embedded in an Epon-Araldite mix (EMS hard formula). Adhesive frames were used (11560294 GENE-FRAME 65L, Thermo Fisher Scientific) for flat embedding, as previously described (Bidaud-Meynard et al., 2019). Ultrathin sections (70 nm thickness) were cut on an ultramicrotome (UC7; Leica Microsystems) and collected on formvar coated slot grids (FCF2010-CU; EMS). Each sample was sectioned at 7-10 different places with  $\geq 5 \mu\text{m}$  between each grid, to ensure that different gut cells were observed. TEM grids were then observed using a JEM-1400 TEM (JEOL) operated at 120 kV, equipped with a Gatan Orius SC1000 camera and piloted by the Digital Micrograph 3.5 program (Gatan).

### Image analysis and quantifications

Images were assembled for illustration using the Fiji and Inkscape 1.1 softwares. All embryos are oriented with the anterior pole to the left. Images obtained with the Airy Scan module were processed to enhance resolution with the ZenBlack software. Max intensity z-projections, orthogonal views and 3D reconstructions were obtained with Fiji. In lineage experiments, there are very strong differences in signal intensities between the *end-1p::GFP::H2B* and *elt-2p::NLS::GFP::LacZ* reporters, with the *elt-2* signal being much stronger than the *end-1* signal. The signal intensities on images from lineage movies were thus adjusted to enable proper visualization of intestinal nuclei at all the embryonic stages observed.

TEM micrographs were analyzed using Fiji. Microvilli length was measured from the tip to the point where their base intersected with the apical pole. Microvilli width was measured at mid-height. Microvilli density was defined as the number of microvilli over 1  $\mu\text{m}$  of lumen perimeter. Junction length correspond to the length of the electron-dense structure.

### Statistical analysis

Statistical analysis and graphic representations were performed with the Graphpad Prism 8.0.1 software. Details of the statistical tests used are indicated in each figure legend.

### **Acknowledgments**

We thank M. Boxem, B. Grant, M. Soto and the *Caenorhabditis* Genetics Center (funded by the National Institute of Health Office of Research Infrastructure Programs, P40 OD010440) for providing worm strains. We also thank the Biology of *Caenorhabditis elegans* Facility (Université Lyon 1, UMS3421) for generating CRISPR strains. We thank Anaëlle Raoul who helped with the characterization of intestinal cell number in *par-4* mutants as well as the Michaux and Pecreaux labs for helpful discussions. Imaging was performed at the Microscopy Rennes imaging Center (MRiC Photonics and TEM, Biosit, Rennes, France), a member of the national infrastructure France-BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04).

### **Funding**

This work was supported by the Ligue Contre le Cancer (22, 35, 41), the Fondation ARC (PJA 20191209366) and the Fondation Maladies Rares (EXM-2019-1013). GM laboratory also received institutional funding from the Centre National De La Recherche Scientifique and the Université de Rennes 1. FD was supported by a grant from the Fondation ARC. The authors declare no competing financial interests.

### **Author contributions**

Conceptualization: F.D., G.M., A.P.; Methodology: F.D., O.N., A.P.; Validation: F.D., O.N., G.M., A.P.; Formal analysis: F.D., O.N., A.P.; Investigation: F.D., O.N., A.P.; Writing – original draft preparation: F.D., A.P.; Writing – Review and editing: F.D., O.N., G.M., A.P.; Visualization: F.D., O.N.; Supervision: G.M., A.P.; Project administration: G.M.; Funding Acquisition: F.D., G.M., A.P.

## References

- Achilleos, A., Wehman, A.M., Nance, J., 2010. PAR-3 mediates the initial clustering and apical localization of junction and polarity proteins during *C. elegans* intestinal epithelial cell polarization. *Development* 137, 1833–1842. <https://doi.org/10.1242/dev.047647>
- Alessi, D.R., Sakamoto, K., Bayascas, J.R., 2006. LKB1-dependent signaling pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 137–163. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142702>
- Amin, N., Khan, A., St Johnston, D., Tomlinson, I., Martin, S., Brenman, J., McNeill, H., 2009. LKB1 regulates polarity remodeling and adherens junction formation in the *Drosophila* eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 8941–8946. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812469106>
- Asan, A., Raiders, S.A., Priess, J.R., 2016. Morphogenesis of the *C. elegans* Intestine Involves Axon Guidance Genes. *PLoS Genet* 12, e1005950. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005950>
- Baas, A.F., Kuipers, J., van der Wel, N.N., Batlle, E., Koerten, H.K., Peters, P.J., Clevers, H.C., 2004. Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell* 116, 457–466. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00114-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00114-x)
- Baugh, L.R., Hill, A.A., Claggett, J.M., Hill-Harfe, K., Wen, J.C., Slonim, D.K., Brown, E.L., Hunter, C.P., 2005. The homeodomain protein PAL-1 specifies a lineage-specific regulatory network in the *C. elegans* embryo. *Development* 132, 1843–1854. <https://doi.org/10.1242/dev.01782>
- Benkemoun, L., Descoteaux, C., Chartier, N.T., Pintard, L., Labbé, J.-C., 2014. PAR-4/LKB1 regulates DNA replication during asynchronous division of the early *C. elegans* embryo. *J Cell Biol* 205, 447–455. <https://doi.org/10.1083/jcb.201312029>
- Bidaud-Meynard, A., Demouchy, F., Nicolle, O., Pacquelet, A., Suman, S.K., Plancke, C.N., Robin, F.B., Michaux, G., 2021. High-resolution dynamic mapping of the *C. elegans* intestinal brush border. *Development* 148, dev200029. <https://doi.org/10.1242/dev.200029>
- Bidaud-Meynard, A., Nicolle, O., Heck, M., Le Cunff, Y., Michaux, G., 2019. A V0-ATPase-dependent apical trafficking pathway maintains the polarity of the intestinal absorptive membrane. *Development* 146, dev174508. <https://doi.org/10.1242/dev.174508>
- Bonaccorsi, S., Mottier, V., Giansanti, M.G., Bolkan, B.J., Williams, B., Goldberg, M.L., Gatti, M., 2007. The *Drosophila* Lkb1 kinase is required for spindle formation and asymmetric neuroblast division. *Development* 134, 2183–2193. <https://doi.org/10.1242/dev.02848>
- Bowerman, B., Eaton, B.A., Priess, J.R., 1992. *skn-1*, a maternally expressed gene required to specify the fate of ventral blastomeres in the early *C. elegans* embryo. *Cell* 68, 1061–1075. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90078-q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90078-q)
- Bowerman, B., Ingram, M.K., Hunter, C.P., 1997. The maternal *par* genes and the segregation of cell fate specification activities in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* 124, 3815–3826. <https://doi.org/10.1242/dev.124.19.3815>
- Calvo, D., Victor, M., Gay, F., Sui, G., Luke, M.P., Dufourcq, P., Wen, G., Maduro, M., Rothman, J., Shi, Y., 2001. A POP-1 repressor complex restricts inappropriate cell type-specific gene transcription during *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *EMBO J* 20, 7197–7208. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.7197>

- Castiglioni, V.G., Pires, H.R., Rosas Bertolini, R., Riga, A., Kerver, J., Boxem, M., 2020. Epidermal PAR-6 and PKC-3 are essential for larval development of *C. elegans* and organize non-centrosomal microtubules. *Elife* 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.62067>
- Chartier, N.T., Salazar Ospina, D.P., Benkemoun, L., Mayer, M., Grill, S.W., Maddox, A.S., Labbé, J.-C., 2011. PAR-4/LKB1 mobilizes nonmuscle myosin through anillin to regulate *C. elegans* embryonic polarization and cytokinesis. *Curr Biol* 21, 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.01.010>
- Choi, H., Broitman-Maduro, G., Maduro, M.F., 2017. Partially compromised specification causes stochastic effects on gut development in *C. elegans*. *Dev Biol* 427, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.05.007>
- Clucas, C., Cabello, J., Büssing, I., Schnabel, R., Johnstone, I.L., 2002. Oncogenic potential of a *C. elegans* *cdc25* gene is demonstrated by a gain-of-function allele. *EMBO J* 21, 665–674. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.4.665>
- Costa, M., Raich, W., Agbunag, C., Leung, B., Hardin, J., Priess, J.R., 1998. A putative catenin-cadherin system mediates morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* embryo. *J. Cell Biol.* 141, 297–308. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.1.297>
- Dickinson, D.J., Schwager, F., Pintard, L., Gotta, M., Goldstein, B., 2017. A Single-Cell Biochemistry Approach Reveals PAR Complex Dynamics during Cell Polarization. *Dev Cell* 42, 416–434. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.07.024>
- Fukushige, T., Hawkins, M.G., McGhee, J.D., 1998. The GATA-factor *elt-2* is essential for formation of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Developmental Biology* 198, 286–302. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(98\)80006-7](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(98)80006-7)
- Gloerich, M., ten Klooster, J.P., Vliem, M.J., Koorman, T., Zwartkruis, F.J., Clevers, H., Bos, J.L., 2012. Rap2A links intestinal cell polarity to brush border formation. *Nat. Cell Biol.* 14, 793–801. <https://doi.org/10.1038/ncb2537>
- Heppert, J.K., Pani, A.M., Roberts, A.M., Dickinson, D.J., Goldstein, B., 2018. A CRISPR Tagging-Based Screen Reveals Localized Players in Wnt-Directed Asymmetric Cell Division. *Genetics* 208, 1147–1164. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300487>
- Hung, T.J., Kemphues, K.J., 1999. PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* 126, 127–135.
- Hunter, C.P., Kenyon, C., 1996. Spatial and temporal controls target *pal-1* blastomere-specification activity to a single blastomere lineage in *C. elegans* embryos. *Cell* 87, 217–226. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81340-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81340-9)
- Katajisto, P., Vaahtomeri, K., Ekman, N., Ventelä, E., Ristimäki, A., Bardeesy, N., Feil, R., DePinho, R.A., Mäkelä, T.P., 2008. LKB1 signaling in mesenchymal cells required for suppression of gastrointestinal polyposis. *Nat Genet* 40, 455–459. <https://doi.org/10.1038/ng.98>
- Kemphues, K.J., Priess, J.R., Morton, D.G., Cheng, N.S., 1988. Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* 52, 311–320.

- Köppen, M., Simske, J.S., Sims, P.A., Firestein, B.L., Hall, D.H., Radice, A.D., Rongo, C., Hardin, J.D., 2001. Cooperative regulation of AJM-1 controls junctional integrity in *Caenorhabditis elegans* epithelia. *Nat. Cell Biol.* 3, 983–991. <https://doi.org/10.1038/ncb1101-983>
- Kostić, I., Roy, R., 2002. Organ-specific cell division abnormalities caused by mutation in a general cell cycle regulator in *C. elegans*. *Development* 129, 2155–2165.
- Krawchuk, D., Anani, S., Honma-Yamanaka, N., Polito, S., Shafik, M., Yamanaka, Y., 2015. Loss of LKB1 leads to impaired epithelial integrity and cell extrusion in the early mouse embryo. *J Cell Sci* 128, 1011–1022. <https://doi.org/10.1242/jcs.162156>
- Lee, J.H., Koh, H., Kim, M., Kim, Y., Lee, S.Y., Karess, R.E., Lee, S.-H., Shong, M., Kim, J.-M., Kim, J., Chung, J., 2007. Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature* 447, 1017–1020. <https://doi.org/10.1038/nature05828>
- Legouis, R., Gansmuller, A., Sookhareea, S., Boshier, J.M., Baillie, D.L., Labouesse, M., 2000. LET-413 is a basolateral protein required for the assembly of adherens junctions in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Cell Biol.* 2, 415–422. <https://doi.org/10.1038/35017046>
- Leung, B., Hermann, G.J., Priess, J.R., 1999. Organogenesis of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev. Biol.* 216, 114–134. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9471>
- Lin, R., 2003. A gain-of-function mutation in *oma-1*, a *C. elegans* gene required for oocyte maturation, results in delayed degradation of maternal proteins and embryonic lethality. *Dev Biol* 258, 226–239. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00119-2](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00119-2)
- Lin, R., Thompson, S., Priess, J.R., 1995. *pop-1* encodes an HMG box protein required for the specification of a mesoderm precursor in early *C. elegans* embryos. *Cell* 83, 599–609. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90100-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90100-0)
- Maduro, M.F., Hill, R.J., Heid, P.J., Newman-Smith, E.D., Zhu, J., Priess, J.R., Rothman, J.H., 2005a. Genetic redundancy in endoderm specification within the genus *Caenorhabditis*. *Developmental Biology* 284, 509–522. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.05.016>
- Maduro, M.F., Kasmir, J.J., Zhu, J., Rothman, J.H., 2005b. The Wnt effector POP-1 and the PAL-1/Caudal homeoprotein collaborate with SKN-1 to activate *C. elegans* endoderm development. *Dev Biol* 285, 510–523. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.06.022>
- Maduro, M.F., Meneghini, M.D., Bowerman, B., Broitman-Maduro, G., Rothman, J.H., 2001. Restriction of mesendoderm to a single blastomere by the combined action of SKN-1 and a GSK-3beta homolog is mediated by MED-1 and -2 in *C. elegans*. *Mol Cell* 7, 475–485. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00195-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00195-2)
- Marston, D.J., Higgins, C.D., Peters, K.A., Cupp, T.D., Dickinson, D.J., Pani, A.M., Moore, R.P., Cox, A.H., Kiehart, D.P., Goldstein, B., 2016. MRCK-1 Drives Apical Constriction in *C. elegans* by Linking Developmental Patterning to Force Generation. *Curr Biol* 26, 2079–2089. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.010>
- Martin, S.G., St Johnston, D., 2003. A role for *Drosophila* LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity. *Nature* 421, 379–384. <https://doi.org/10.1038/nature01296>

- McMahon, L., Legouis, R., Vonesch, J.L., Labouesse, M., 2001. Assembly of *C. elegans* apical junctions involves positioning and compaction by LET-413 and protein aggregation by the MAGUK protein DLG-1. *J. Cell. Sci.* 114, 2265–2277.
- Morton, D.G., Roos, J.M., Kempfues, K.J., 1992. *par-4*, a gene required for cytoplasmic localization and determination of specific cell types in *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *Genetics* 130, 771–790.
- Negishi, T; Asakawa, M; Kanemaki, MT; Sawa, H, 2019. Modified auxin improves the auxin-inducible degradation (AID) system for laid *C. elegans* embryos.
- Ollila, S., Domènech-Moreno, E., Laajanen, K., Wong, I.P., Tripathi, S., Pentimikko, N., Gao, Y., Yan, Y., Niemelä, E.H., Wang, T.C., Viollet, B., Leone, G., Katajisto, P., Vaahtomeri, K., Mäkelä, T.P., 2018. Stromal Lkb1 deficiency leads to gastrointestinal tumorigenesis involving the IL-11-JAK/STAT3 pathway. *J Clin Invest* 128, 402–414. <https://doi.org/10.1172/JCI93597>
- Partanen, J.I., Tervonen, T.A., Klefström, J., 2013. Breaking the epithelial polarity barrier in cancer: the strange case of LKB1/PAR-4. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 368, 20130111. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0111>
- Pickett, M.A., Sallee, M.D., Naturale, V.F., Akpinaroglu, D., Lee, J., Shen, K., Feldman, J.L., 2021. Separable mechanisms drive local and global polarity establishment in the *C. elegans* intestinal epithelium (preprint). *Cell Biology*. <https://doi.org/10.1101/2021.11.01.466827>
- Poffenberger, M.C., Metcalfe-Roach, A., Aguilar, E., Chen, J., Hsu, B.E., Wong, A.H., Johnson, R.M., Flynn, B., Samborska, B., Ma, E.H., Gravel, S.-P., Tonelli, L., Devorkin, L., Kim, P., Hall, A., Izreig, S., Loginicheva, E., Beauchemin, N., Siegel, P.M., Artyomov, M.N., Lum, J.J., Zogopoulos, G., Blagih, J., Jones, R.G., 2018. LKB1 deficiency in T cells promotes the development of gastrointestinal polyposis. *Science* 361, 406–411. <https://doi.org/10.1126/science.aan3975>
- Raj, A., Rifkin, S.A., Andersen, E., van Oudenaarden, A., 2010. Variability in gene expression underlies incomplete penetrance. *Nature* 463, 913–918. <https://doi.org/10.1038/nature08781>
- Ramalho, J.J., Sepers, J.J., Nicolle, O., Schmidt, R., Cravo, J., Michaux, G., Boxem, M., 2020. C-terminal phosphorylation modulates ERM-1 localization and dynamics to control cortical actin organization and support lumen formation during *Caenorhabditis elegans* development. *Development* 147, dev188011. <https://doi.org/10.1242/dev.188011>
- Rivers, D.M., Moreno, S., Abraham, M., Ahringer, J., 2008. PAR proteins direct asymmetry of the cell cycle regulators Polo-like kinase and Cdc25. *J. Cell Biol.* 180, 877–885. <https://doi.org/10.1083/jcb.200710018>
- Rocheleau, C.E., Downs, W.D., Lin, R., Wittmann, C., Bei, Y., Cha, Y.-H., Ali, M., Priess, J.R., Mello, C.C., 1997. Wnt Signaling and an APC-Related Gene Specify Endoderm in Early *C. elegans* Embryos. *Cell* 90, 707–716. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80531-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80531-0)
- Roy, V., Gagné, O., Hamiche, K., Labbé, J.-C., Narbonne, P., 2018. Expression pattern of endogenous PAR-4A & C after CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *MicroPubl Biol* 2018. <https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000075>

- Sallee, M.D., Pickett, M.A., Feldman, J.L., 2021. Apical PAR complex proteins protect against programmed epithelial assaults to create a continuous and functional intestinal lumen. *Elife* 10, e64437. <https://doi.org/10.7554/eLife.64437>
- Sasidharan, S., Borinskaya, S., Patel, F., Bernadskaya, Y., Mandalapu, S., Agapito, M., Soto, M.C., 2018. WAVE regulates Cadherin junction assembly and turnover during epithelial polarization. *Dev Biol* 434, 133–148. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.12.002>
- Schlesinger, A., Shelton, C.A., Maloof, J.N., Meneghini, M., Bowerman, B., 1999. Wnt pathway components orient a mitotic spindle in the early *Caenorhabditis elegans* embryo without requiring gene transcription in the responding cell. *Genes Dev* 13, 2028–2038. <https://doi.org/10.1101/gad.13.15.2028>
- Segbert, C., Johnson, K., Theres, C., van Fürden, D., Bossinger, O., 2004. Molecular and functional analysis of apical junction formation in the gut epithelium of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 266, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.10.019>
- Shetty, P., Lo, M.-C., Robertson, S.M., Lin, R., 2005. *C. elegans* TCF protein, POP-1, converts from repressor to activator as a result of Wnt-induced lowering of nuclear levels. *Developmental Biology* 285, 584–592. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.07.008>
- Shirayama, M., Soto, M.C., Ishidate, T., Kim, S., Nakamura, K., Bei, Y., van den Heuvel, S., Mello, C.C., 2006. The Conserved Kinases CDK-1, GSK-3, KIN-19, and MBK-2 Promote OMA-1 Destruction to Regulate the Oocyte-to-Embryo Transition in *C. elegans*. *Curr Biol* 16, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.070>
- Shorning, B.Y., Zabkiewicz, J., McCarthy, A., Pearson, H.B., Winton, D.J., Sansom, O.J., Ashworth, A., Clarke, A.R., 2009. *Lkb1* deficiency alters goblet and paneth cell differentiation in the small intestine. *PLoS One* 4, e4264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004264>
- Sommermann, E.M., Strohmaier, K.R., Maduro, M.F., Rothman, J.H., 2010. Endoderm development in *Caenorhabditis elegans*: the synergistic action of ELT-2 and -7 mediates the specification→differentiation transition. *Dev. Biol.* 347, 154–166. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.08.020>
- Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., Thomson, J.N., 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 100, 64–119. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90201-4)
- ten Klooster, J.P., Jansen, M., Yuan, J., Oorschot, V., Begthel, H., Di Giacomo, V., Colland, F., de Koning, J., Maurice, M.M., Hornbeck, P., Clevers, H., 2009. Mst4 and Ezrin induce brush borders downstream of the *Lkb1*/Strad/Mo25 polarization complex. *Dev. Cell* 16, 551–562. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.01.016>
- Tenlen, J.R., Molk, J.N., London, N., Page, B.D., Priess, J.R., 2008. MEX-5 asymmetry in one-cell *C. elegans* embryos requires PAR-4- and PAR-1-dependent phosphorylation. *Development* 135, 3665–3675. <https://doi.org/10.1242/dev.027060>
- Thorpe, C.J., Schlesinger, A., Carter, J.C., Bowerman, B., 1997. Wnt Signaling Polarizes an Early *C. elegans* Blastomere to Distinguish Endoderm from Mesoderm. *Cell* 90, 695–705. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80530-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80530-9)

- Totong, R., Achilleos, A., Nance, J., 2007. PAR-6 is required for junction formation but not apicobasal polarization in *C. elegans* embryonic epithelial cells. *Development* 134, 1259–1268. <https://doi.org/10.1242/dev.02833>
- Watts, J.L., Morton, D.G., Bestman, J., Kemphues, K.J., 2000. The *C. elegans* par-4 gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development* 127, 1467–1475.
- Wiesenfahrt, T., Berg, J.Y., Osborne Nishimura, E., Robinson, A.G., Goszczynski, B., Lieb, J.D., McGhee, J.D., 2016. The function and regulation of the GATA factor ELT-2 in the *C. elegans* endoderm. *Development* 143, 483–491. <https://doi.org/10.1242/dev.130914>
- Zhang, L., Ward, J.D., Cheng, Z., Dernburg, A.F., 2015. The auxin-inducible degradation (AID) system enables versatile conditional protein depletion in *C. elegans*. *Development* 142, 4374–4384. <https://doi.org/10.1242/dev.129635>
- Zhu, J., Fukushige, T., McGhee, J.D., Rothman, J.H., 1998. Reprogramming of early embryonic blastomeres into endodermal progenitors by a *Caenorhabditis elegans* GATA factor. *Genes Dev* 12, 3809–3814. <https://doi.org/10.1101/gad.12.24.3809>
- Zhu, J., Hill, R.J., Heid, P.J., Fukuyama, M., Sugimoto, A., Priess, J.R., Rothman, J.H., 1997. end-1 encodes an apparent GATA factor that specifies the endoderm precursor in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Genes & Development* 11, 2883–2896. <https://doi.org/10.1101/gad.11.21.2883>

## Figure legends

### Figure 1: PAR-4 is not strictly required for intestinal cell polarity and microvilli formation in *C. elegans*

**embryos. (A)** Confocal images of embryos of the indicated stages expressing endogenously tagged mNG::PAR-4. Scale bar: 6  $\mu\text{m}$ . The higher magnification image at the lima bean stage shows the localization of mNG::PAR-4 in enterocytes, both on the apical and basolateral membranes and on subapical foci (arrowheads). Scale bar: 3  $\mu\text{m}$ . **(B)** Maximum Z-projections from confocal images of lima bean control and *par-4(it47)* embryos expressing PAR-6::GFP. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . **(C)** Maximum Z-projections from confocal images of 2-fold control and *par-4(it47)* embryos co-expressing LET-413::mNG (green) and PAR-6::mKate2 (magenta). Zoomed-in images show basolateral LET-413::mNG signal (green, arrowheads) compared to apical PAR-6::mKate2 localization (magenta). Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . **(D)** Super-resolution (SR) confocal microscopy images of 3-4-fold control and *par-4(it47)* embryos co-expressing ERM-1::mNG (green) and IFB-2::wScarlet (magenta). TW: terminal web. MV: microvilli. Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ . **(E)** TEM images of transversal sections showing the brush border in 3-4-fold control and *par-4(it47)* embryos. Scale bar: 100 nm. **(F)** Quantification of microvilli density, length, width and length/width ratio obtained from TEM images of 3-4-fold control and *par-4(it47)* embryos. Microvilli density corresponds to the number of microvilli per  $\mu\text{m}$ . Values were obtained from 5 control and 9 *par-4(it47)* embryos, measuring density in more than 7 areas and microvilli characteristics for more than 20 microvilli per embryo. Violin plots show all individual values (dots) and the mean (bold black line). They were obtained by pulling the data of all embryos. n indicates the total number of either areas or microvilli measured. \*\*\*P<0.001. Statistical significance was calculated using a Mann-Whitney test.

### Figure 2: PAR-4 regulates lumen architecture and intestinal cell number. (A)

3-4-fold control and *par-4(it47)* embryos expressing ERM-1::mNG. Left and right panels show 3D reconstructions and orthogonal views, respectively. Dotted lines on the left panel indicate the plane used to show the orthogonal view on the right panel. Super-resolution images are shown for illustration, quantifications were obtained with embryos observed with a standard confocal microscope. Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ . **(B)** TEM

images of transversal sections of 3-4-fold control and *par-4(it47)* embryos. The intestinal lumen is surrounded by a yellow line, apical junctions are indicated by red arrowheads. Scale bar: 0.5  $\mu\text{m}$ . **(C)** Maximum Z-projections from SR confocal microscopy images of 2-fold control and *par-4(it47)* embryos co-expressing DLG-1::mNG (green) and HMR-1::mKate2 (magenta). Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . **(D)** Maximum Z-projections from confocal images of 2-fold control and *par-4(it47)* embryos expressing *elt-2p::NLS::GFP::LacZ* and quantification of the number of intestinal nuclei in those embryos. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . Violin plots show all individual values (dots) and the mean (bold black line). Dark orange dots correspond to embryos with an excess of intestinal nuclei. \*\*\* $P < 0.001$ . Statistical significance was calculated using a Mann-Whitney test.

**Figure 3: Defects in intestinal epithelium organization are due to the presence of additional cells. (A)** Maximum Z-projections from confocal images of 2-fold control and *par-4(it47)* embryos co-expressing *elt-2p::NLS::GFP::LacZ* and HMR-1::mKate2. Zoomed-in images show high magnification of apical junctions (HMR-1::mKate2). Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . **(B)** SR confocal microscopy images of 3-4-fold control and *par-4(it47)* embryos co-expressing ERM-1::mNG (green) and HMR-1::mKate2 (magenta). Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ . **(C)** Confocal images of 3-4-fold control and *par-4(it47)* embryos expressing *vha-6p::PH::GFP*. Left and right panels show longitudinal and orthogonal views, respectively. Dotted lines on the left panel indicate the plane used to show the orthogonal view on the right panel. White asterisks on orthogonal views indicate cells surrounding the lumen. Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ . **(D)** TEM images of transversal sections of 3-4-fold control and *par-4(it47)* embryos. Each intestinal cell is labelled by a different color. Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ .

**Figure 4: *cdc-25.1(gof)* mutants also display defects in lumen architecture. (A)** Confocal images of 3-4-fold control and *cdc-25.1(rr31)* embryos expressing *vha-6p::PH::GFP* and *elt-2p::NLS::GFP::LacZ*. Left and right panels show longitudinal and orthogonal views, respectively. Dotted lines on the left panel indicate the plane used to show the orthogonal view on the right panel. White asterisks on orthogonal views indicate cells surrounding the lumen. Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ . **(B)** TEM images of 3-4-fold control and *cdc-25.1(rr31)* embryos. **(left)** The intestinal lumen is surrounded by a yellow line, apical junctions are

indicated by red arrowheads. Scale bar: 0.5  $\mu\text{m}$ . **(right)** Each intestinal cell is labelled by a different color. Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ .

**Figure 5: PAR-4 does not regulate cell proliferation in the E lineage. (A)** Schematic representation of intestinal development stages during *C. elegans* embryogenesis. Enterocytes are generated by the E blastomere, which divides to give rise to E2, E4, E8 and E16 stages. The final E20 stage is reached at the 2-fold stage. Intestinal cells are represented in orange and their nuclei in dark red. **(B)** Maximum Z-projections from intestinal cell lineage movies in control, *par-4(it47)* and *cdc-25.1(rr31)* embryos. Embryos co-express two intestinal-specific nuclear markers: *end-1p::GFP::H2B* from E2 to E8 and *elt-2p::NLS::GFP::LacZ* from E8 to the end of intestinal cell divisions. In this experiment, 17/19 embryos showed such a phenotype. 2/19 embryos also exhibited ectopic expression of *end-1* outside the E lineage (not shown). Intestinal stages and corresponding times are indicated (in hour:min). Scale bar: 5 $\mu\text{m}$ . **(C)** Quantification of E2, E4 and E8 cell cycle lengths in control (n = 13), *par-4(it47)* (n = 19) and *cdc-25.1(rr31)* (n = 16) embryos. Violin plots show all individual values, plus the mean (bold black line). Dark red dots represent values in the two *par-4(it47)* embryos that ectopically express *end-1* signal in other cells than E descendants. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, n.s: non-significant (P>0.05). Statistical significance was calculated using a Student's *t*-test (E4-E8 control/*par-4(it47)* and E8-E16 control/*cdc-25.1(rr31)*) or a Mann-Whitney test (other comparisons). **(D)** Control and *par-4(it47)* embryos expressing *elt-2p::NLS::GFP::LacZ* were imaged at lima bean stage and one to two hours later. Embryo morphology is shown through the brightfield channel. Nuclei are shown with maximum Z-projections from confocal images. While all control embryos had started elongation, 7/37 *par-4(it47)* embryos did not elongate. Scale bar: 5 $\mu\text{m}$ .

**Figure 6: PAR-4 restricts intestinal specification to the E blastomere. (A)** Maximum Z-projections from images of E2 and E4 stages from intestinal cell lineage movies in control and *par-4(it47)* embryos co-expressing *end-1p::GFP::H2B* and *elt-2p::NLS::GFP::LacZ*. 19/36 (53%) of *par-4(it47)* embryos present an ectopic *end-1* signal, most of them in the Cp lineage. Blue arrowheads indicate cells that ectopically express *end-1p::GFP::H2B* in the C lineage. **(B)** Quantification of E2 and E4 cell cycle lengths in control

(n = 6) and *par-4(it47)* (n = 36) embryos. Violin plots show all individual values, plus the mean (bold black line). Dark red dots represent values in *par-4(it47)* embryos that ectopically express the *end-1* signal in other cells than E descendants. n.s: non-significant ( $P > 0.05$ ). Statistical significance was calculated using a Mann-Whitney test. **(C)** Schematic representation of 8-cell embryos and E2 stage during embryogenesis in control and *par-4(it47)* backgrounds. In control embryos, E and C descendants are drawn in orange and blue, respectively. In some *par-4(it47)* embryos, Cp adopts an intestinal-like fate by expressing *end-1*. **(D)** Images from movies in control and *par-4(it47)* embryos that co-express *end-1p::GFP::H2B* (yellow) and a *mex-5p::PH::mKate2* membrane marker (magenta). Intestinal stages and corresponding times are indicated (hour:min). Ea and Ep and their daughters are marked with white lines. Ca is marked with a blue asterisk and Cp and its daughters with a yellow asterisk. Scale bar: 5 $\mu$ m. **(E-H)** Maximum Z-projections from images from intestinal cell lineage movies from E2 to E8 stages in control **(E)** and *par-4(it47)* embryos **(F-H)**. Embryos co-express *end-1p::GFP::H2B* and *elt-2p::NLS::GFP::LacZ*. The *elt-2p::NLS::GFP::LacZ* signal starts to be visible at the E8 stage. On those images, signal intensities were adjusted to optimize the visualization of intestinal nuclei at all stages. On non adjusted images, the strong intensity of the *elt-2p::NLS::GFP::LacZ* signal allows it to be easily distinguished from the much weaker *end-1p::GFP::H2B* signal. Orange arrowheads indicate E descendants. Blue and pink arrowheads indicate cells that ectopically express *end-1p::GFP::H2B* in the Cp and the MSp lineage, respectively. In *par-4(it47)* embryos exhibiting ectopic *end-1* signal, *elt-2* can for example be expressed in some E cells and in some ectopic cells (F), in all E descendants but not in ectopic cells (G) or in all E cells and ectopic cells (H). In (F), 5 descendants of Cp are present on the last image, only 4 express *elt-2* and are indicated with blue arrowheads, 8 descendants of E are present, only 5 express *elt-2* and are indicated with orange arrowheads. In (H), 4 descendants of Cp and 8 descendants of E are present, all express *elt-2*. Scale bar: 5 $\mu$ m. **(I)** Pie chart representing the distribution of *elt-2* expression in *par-4(it47)* embryos that exhibit ectopic *end-1* signal. Each color corresponds to a distinct phenotype. Percentages of each phenotype are indicated.

**Figure S1: PAR-4 loss-of-function induces mild microvilli defects. (A-C)** Quantification of microvilli density (A), length (B) and width (C) in 3-4-fold control and *par-4(it47)* embryos from TEM images. Microvilli density corresponds to the number of microvilli per  $\mu\text{m}$ . Values were obtained from 5 control and 9 *par-4(it47)* embryos, measuring density in more than 7 areas and microvilli characteristics for more than 20 microvilli per embryo. Violin plots show all individual values (dots) and the mean (bold black line). Control and *par-4(it47)* plots on the left were obtained by pulling the data of all embryos, other plots correspond to the measurements made for each single embryo. n indicates the number of either areas or microvilli measured. Samples for which sections with more than 5 CeAJs and more than 4 intestinal cells per intestinal ring were observed are circled. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Statistical significance was calculated using a Mann-Whitney test.

**Figure S2: PAR-4 controls lumen morphology, apical junction number and junction length. (A)** Maximum Z-projections from confocal images of 2-fold control and *par-4(it47)* embryos expressing ERM-1::mNG. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . **(B)** SR confocal images of 3-4-fold control and *par-4(it47)* embryos co-expressing ERM-1::mNG (green) and IFB-2::wScarlet (magenta). Arrowheads indicate apical membrane deformations. Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ . **(C)** Maximum Z-projections from confocal images of 2-fold control and *par-4(it47)* embryos expressing DLG-1::mNG, HMR-1::GFP or HMP-1::GFP. Zoomed-in images show high magnification of apical junctions. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . **(D)** Quantification of the percentage of 2-fold and 3-4-fold *par-4(it47)* embryos with additional CeAJs in the three different strains. **(E)** TEM images of transversal sections of 3-4-fold control and *par-4(it47)* embryos and quantification of junction length. CeAJs are colored in magenta. Scale bar: 100 nm. Values were obtained from 5 control and 9 *par-4(it47)* embryos, measuring more than 15 junctions for each embryo. Violin plots show all individual values (dots) and the mean (bold black line). Control and *par-4(it47)* plots on the left were obtained by pulling the data of all embryos, other plots correspond to the measurements made for each single *par-4(it47)* embryo. n indicates the number of junctions measured. Samples for which sections with more than 5 CeAJs and more than 4 intestinal cells per intestinal ring were observed are circled. Violin plots show all individual values (dots) and the mean (bold black line). \*\*\* $P < 0.001$ .

Statistical significance was calculated using a Mann-Whitney test. **(F)** Quantification of intestinal nuclei number in 2-fold control and *par-4(it47)* embryos at permissive temperature (15°C). Violin plots show all individual values (dots) and the mean (bold black line).

**Figure S3: CDC-25.1 gain-of-function phenotype is not completely similar to the phenotype induced by PAR-4 loss-of-function.**

**(A)** Maximum Z-projections from confocal images of 2-fold control and *cdc-25.1(rr31)* embryos co-expressing *elt-2p::NLS::GFP::LacZ* and *HMR-1::mKate2* and quantification of the number of intestinal nuclei in those embryos. Zoomed-in images showing *HMR-1::mKate2* marker. Scale bar: 5  $\mu$ m. Violin plots show all individual values, plus the mean (bold black line). \*\*\* $P < 0.001$ . Statistical significance was calculated using a Student's *t*-test. **(B)** TEM images of transversal sections of the brush border in 3-4-fold control and *cdc-25.1(rr31)* embryos. Scale bar: 100 nm. **(C)** Quantification of microvilli density, length, width and length/width ratio in 3-4-fold control and *cdc-25.1(rr31)* embryos from TEM images. Microvilli density corresponds to the number of microvilli per  $\mu$ m. **(D)** TEM images of transversal sections of 3-4-fold control and *cdc-25.1(rr31)* embryos and quantification of junction length. CeAJs are colored in magenta. Scale bar: 200 nm. In (C-D) values were obtained from 5 control and 7 *cdc-25.1(rr31)* embryos, measuring density in more than 10 areas, microvilli characteristics for more than 19 microvilli and junction length for more than 11 junctions per embryo. Violin plots show all individual values (dots) and the mean (bold black line). They were obtained by pulling the data of all embryos. *n* indicates the total number of either areas, microvilli or junctions measured. ns: non-significant;  $P > 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Statistical significance was calculated using a Student's *t*-test (for microvilli density) or a Mann-Whitney test (for other parameters).

**Figure S4: PAR-4 degradation in enterocytes does not affect intestinal cell number.**

**(A)** Confocal images of E16 embryos expressing only *PAR-4::mKate2::AID* or both *PAR-4::mKate2::AID* and *elt-2p::TIR-1::BFP* after 1h15 auxin treatment. In embryos co-expressing these transgenes, *PAR-4* is specifically degraded in intestinal cells (surrounded with dashed line). These embryos are called *PAR-4<sup>gut(-)</sup>* embryos. Scale bar: 5  $\mu$ m. **(B)** Maximum Z-projections from confocal images of 2-fold embryos

expressing *elt-2p::NLS::GFP::LacZ* in a control or a *PAR-4<sup>gut(-)</sup>* background after 6h auxin treatment.  
Scale bar: 5 $\mu$ m.

**Figure S5: PAR-4 prevents expression of END-1 in the C lineage.** Cell lineage movies in control and *par-4(it47)* embryos expressing *end-1p::GFP::H2B* and *elt-2p::NLS::GFP::LacZ*. Embryo morphology is shown through the brightfield channel. The position of C, Ca, Cp and Cpp/Cpp (noted Cp2) blastomeres is indicated with the magenta line. Images of *end-1* expressing nuclei (yellow) are superposed with brightfield images (left panels) or shown as maximum Z-projections (right panels). Blue arrowheads indicate nuclei from Cpa and Cpp nuclei expressing *end-1*. *end-1* is also expressed in two other nuclei, which correspond to Ea and Ep. Scale bar: 5 $\mu$ m.

**Movie 1: Dynamic behaviour of mNG::PAR-4 foci in polarizing enterocytes.** Large PAR-4 foci move in the vicinity of the apical membrane while small foci move along the lateral membranes. Images were acquired every 15 sec and movie is played at 10 frames per second.

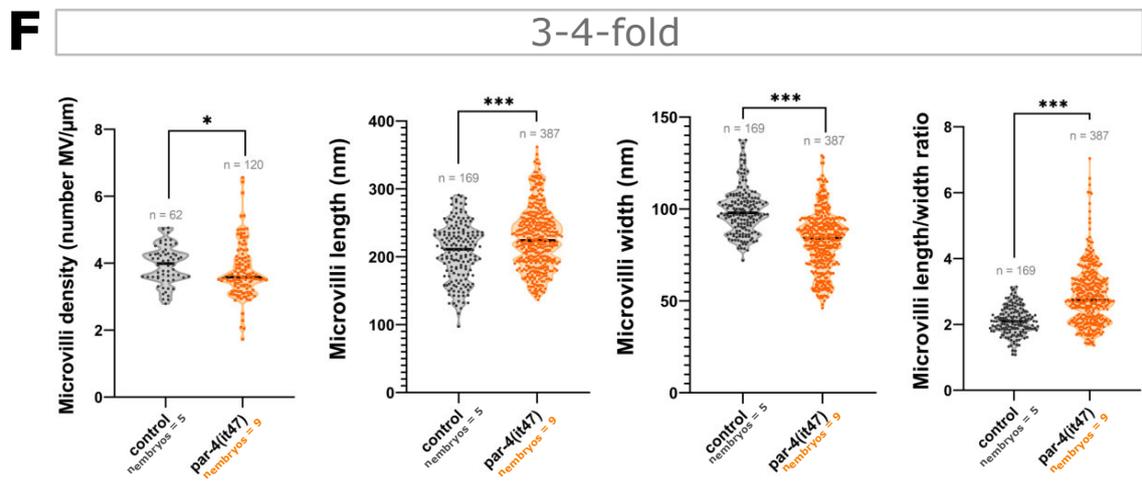
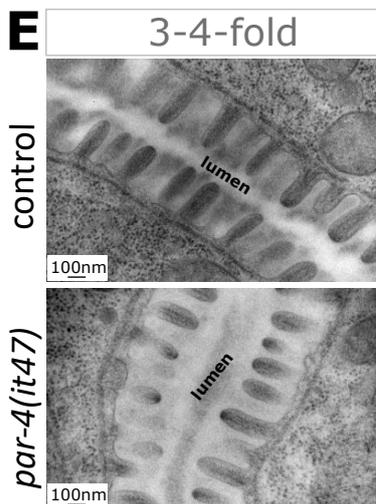
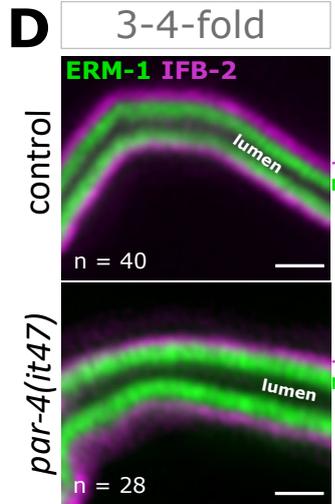
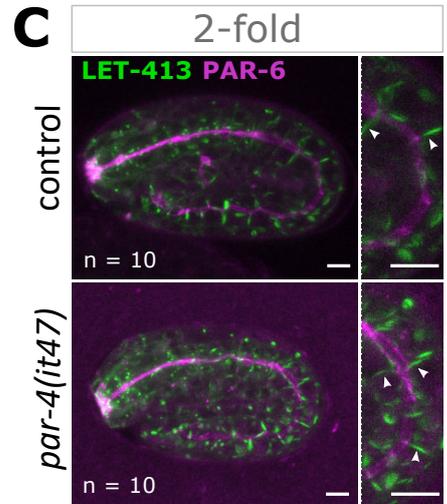
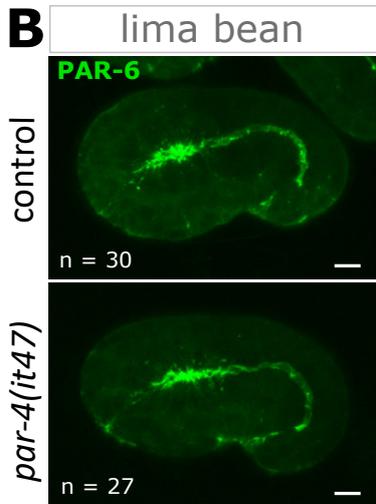
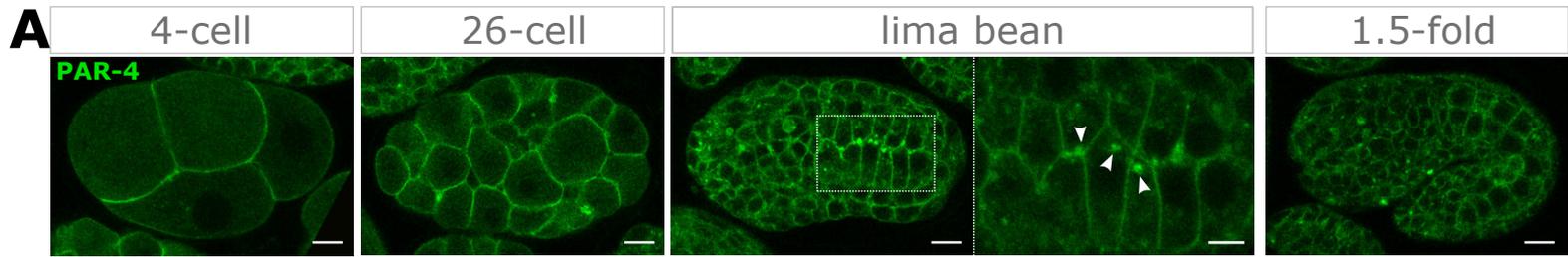
**Table S1: *C. elegans* strains used in this study**

Strain	Complete genotype	Source	Figures
FL280	<i>par-4(bab151[mNG::par-4]) V</i>	This study	Fig.1A
KK1248	<i>par-6(it319[par-6::gfp]) I</i>	Kemphues lab, via CGC	Fig.1B
FL249	<i>par-6(it319[par-6::gfp]) I; par-4(it47) V</i>	This study	Fig.1B
FL626	<i>par-6(cp60[par-6::mKate2::3xMyc + LoxP unc-119(+ LoxP)]) I; let-413c(bab270[let-413c::mNG]) V</i>	This study <i>par-6(cp60)</i> from LP244 (Goldstein lab, via CGC (Dickinson et al., 2017))	Fig.1C
FL627	<i>par-6(cp60[par-6::mKate2::3xMyc + LoxP unc-119(+ LoxP)]) I; let-413c(bab270[let-413c::mNG]) par-4(it47) V</i>	This study	Fig.1C
FL274	<i>erm-1(bab59[erm-1::mNG^SEC^3xFlag]) I; ifb-2(bab142[ifb-2::wSc]) II</i>	Bidaud-Meynard et al., 2019	Fig.1D Fig.S2B
FL278	<i>erm-1(bab59[erm-1::mNG^SEC^3xFlag]) I; ifb-2(bab142[ifb-2::wSc]) II; par-4(it47) V</i>	This study	Fig.1D Fig.S2B
N2		CGC	Fig.1E-F Fig.2B Fig.3D Fig.S1 Fig.S2E
KK184	<i>par-4(it47) V</i>	Kemphues lab, via CGC (Kemphues et al., 1988)	Fig.1E-F Fig.2B Fig.3D Fig.S1 Fig.S2E
FL378	<i>erm-1(bab59[erm-1::mNG^SEC^3xFlag]) I</i>	Bidaud-Meynard et al., 2019	Fig.2A Fig.S2A
FL250	<i>erm-1(bab59[erm-1::mNG^SEC^3xFlag]) I; par-4(it47) V</i>	This study	Fig.2A Fig.S2A
FL277	<i>hmr-1(cp57[hmr-1::mKate2]) I; dlg-1(cp301[dlg-1::mNG-C1^3xFlag]) X</i>	This study <i>hmr-1(cp57)</i> from OX704 (Soto lab, (Sasidharan et al., 2018), originally from LP238, Goldstein lab)	Fig.2C
FL286	<i>hmr-1(cp57[hmr-1::mKate2]) I; par-4(it47) V; dlg-1(cp301[dlg-1::mNG-C1^3xFlag]) X</i>	This study	Fig.2C
MS438	<i>irls25[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + rol-6(su1006)] V</i>	Maduro lab, via CGC (Maduro et al., 2001)	Fig.2D
FL500	<i>par-4(it47) irls25[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + rol-6(su1006)] V</i>	This study	Fig.2D
FL519	<i>hmr-1(cp57[hmr-1::mKate2]) I; rrls1[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + unc-119(+)] X</i>	This study	Fig.3A Fig.S3A
FL532	<i>hmr-1(cp57[hmr-1::mKate2]) I; par-4(it47) V; rrls1[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + unc-119(+)] X</i>	This study	Fig.3A
FL285	<i>hmr-1(cp57[hmr-1::mKate2]) I; erm-1(bab59[erm-1::mNG^3xFlag]) I</i>	This study	Fig.3B
FL294	<i>hmr-1(cp57[hmr-1::mKate2]) I; erm-1(bab59[erm-1::mNG^3xFlag]) I; par-4(it47) V</i>	This study	Fig.3B
RT1120	<i>unc-119(ed3) III; pwls446[vha- 6p::GFP::PH + Cbunc-119]</i>	B. Grant lab	Fig.3C
FL291	<i>par-4(it47) V; pwls446[vha- 6p::GFP::PH + Cbunc-119]</i>	This study	Fig.3C

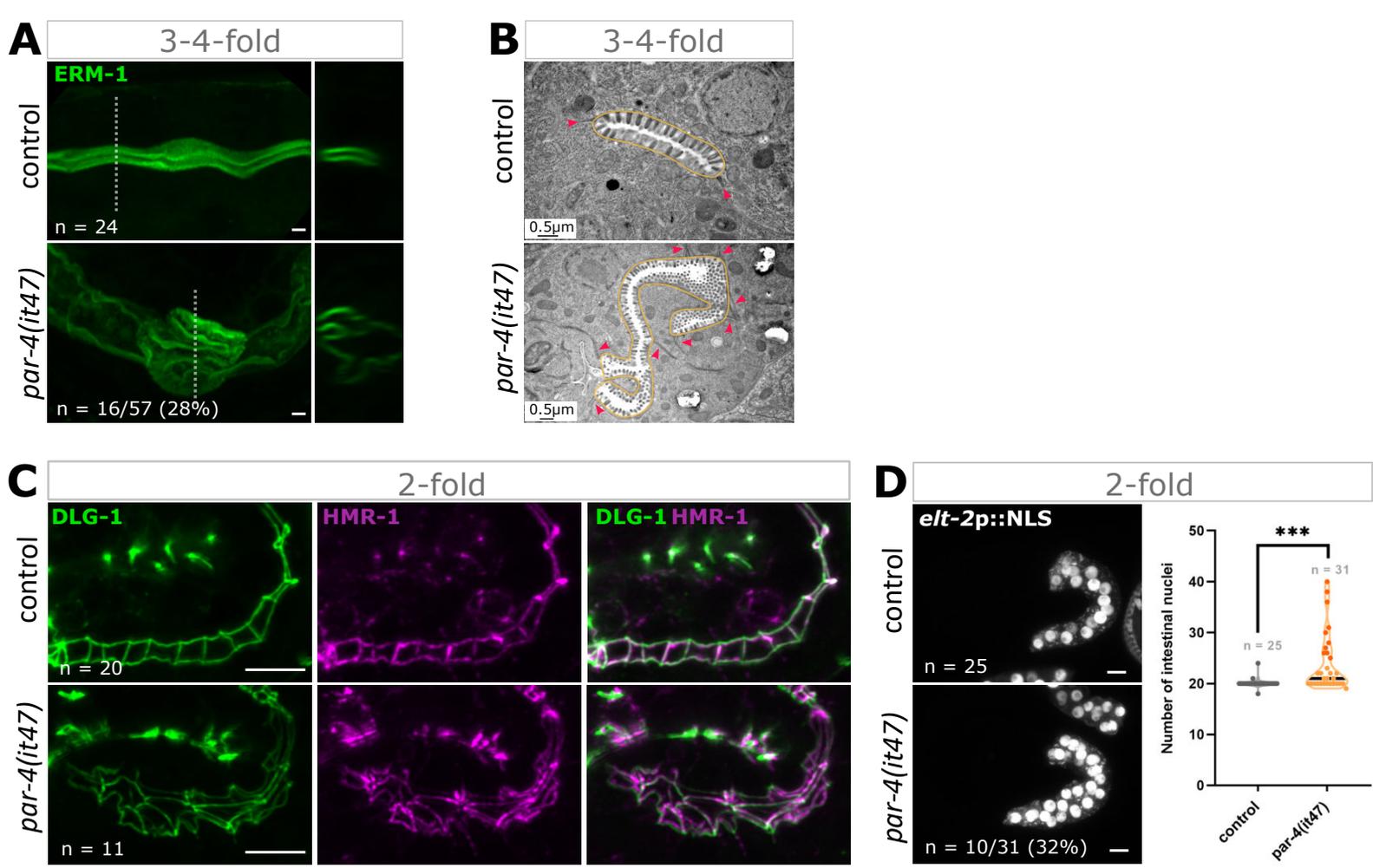
FL560	<i>rrls1[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + unc-119(+)] X; pwls446[vha-6p::GFP::PH + Cbunc-119]</i>	This study	Fig.4A
FL562	<i>cdc-25.1(rr31) I; rrls1[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + unc-119(+)] X; pwls446[vha-6p::GFP::PH + Cbunc-119]</i>	This study	Fig.4A
FL520	<i>rrls1[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + unc-119(+)] X</i>	This study	Fig.4B Fig.S2F Fig.S4B Fig.S3B-D
MR142	<i>cdc-25.1(rr31) I; rrls1[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + unc-119(+)] X</i>	Roy lab, via CGC (Kostić and Roy, 2002)	Fig.4B Fig.S3B-D
FL536	<i>hmr-1(cp57[hmr-1::mKate2]) I; tels46[end-1p::GFP::H2B + unc-119(+)] IV; rrls1[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + unc-119(+)] X</i>	This study <i>tels46</i> from TX691 (Lin lab, via CGC (Shetty et al., 2005))	Fig.5B-D Fig.6A,B,E-I Fig.S5
FL555	<i>hmr-1(cp57[hmr-1::mKate2]) I; tels46[end-1p::GFP::H2B + unc-119(+)] IV; par-4(it47) V; rrls1[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + unc-119(+)] X</i>	This study	Fig.5B-D Fig.6A,B,E-I Fig.S5
FL561	<i>cdc-25.1(rr31) hmr-1(cp57[hmr-1::mKate2]) I; tels46[end-1p::GFP::H2B + unc-119(+)] IV; rrls1[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + unc-119(+)] X</i>	This study	Fig.5B,C
FL690	<i>cpIs54[mex-5p::mKate2::PLC(delta)-PH(A735T)::tbb-2 3'UTR + unc-119 (+)] II; tels46[end-1p::GFP::H2B + unc-119(+)] IV; rrls1[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + unc-119(+)] X</i>	This study <i>cpIs54</i> from LP307 (Goldstein lab, via CGC (Heppert et al., 2018))	Fig.6D
FL689	<i>cpIs54[mex-5p::mKate2::PLC(delta)-PH(A735T)::tbb-2 3'UTR + unc-119 (+)] II; tels46[end-1p::GFP::H2B + unc-119(+)] IV; par-4(it47) V; rrls1[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + unc-119(+)] X</i>	This study	Fig.6D
LP598	<i>dlg-1(cp301[dlg-1::mNG-C1<sup>3</sup>xFlag]) X</i>	Goldstein lab, via CGC (Heppert et al., 2018)	Fig.S2C-D
FL276	<i>par-4(it47) V; dlg-1(cp301[dlg-1::mNG-C1<sup>3</sup>xFlag]) X</i>	This study	Fig.S2C-D
LP172	<i>hmr-1(cp21[hmr-1::GFP + LoxP]) I</i>	Goldstein lab, via CGC (Marston et al., 2016)	Fig.S2C-D
FL267	<i>hmr-1(cp21[hmr-1::GFP + LoxP]) I; par-4(it47) V</i>	This study	Fig.S2C-D
LP191	<i>unc-119(ed3) III; hmp-1(cp20[hmp-1::GFP + LoxP unc-119(+)] V</i>	Goldstein lab, via CGC (Marston et al., 2016)	Fig.S2C-D
FL275	<i>hmp-1(cp20[hmp-1::GFP + LoxP unc-119(+)] V</i>	This study	Fig.S2C-D
FL533	<i>par-4(it47) V; rrls1[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + unc-119(+)] X</i>	This study	Fig.S2F
FL531	<i>cdc-25.1(rr31) hmr-1(cp57[hmr-1::mKate2]) I; rrls1[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + unc-119(+)] X</i>	This study	Fig.S3A
FL602	<i>par-4(bab286[mKate2::AID]) V</i>	This study	Fig.S4A
FL616	<i>mibIs48[elt-2p::TIR-1::tagBFP2-Lox511::tbb-2-3'UTR, IV:5014740-5014802(cxTi10882 site)]IV; par-4(bab286[mKate2::AID]) V</i>	This study <i>mibIs48</i> from BOX273 (Boxem lab (Castiglioni et al., 2020))	Fig.S4A
FL647	<i>mibIs48[elt-2p::TIR-1::tagBFP2-Lox511::tbb-2-3'UTR, IV:5014740-5014802(cxTi10882 site)]IV; par-4(bab286[mKate2::AID]) V; rrls1[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + unc-119(+)] X</i>	This study	Fig.S4B

**Table S2: Summary of experimental conditions used**

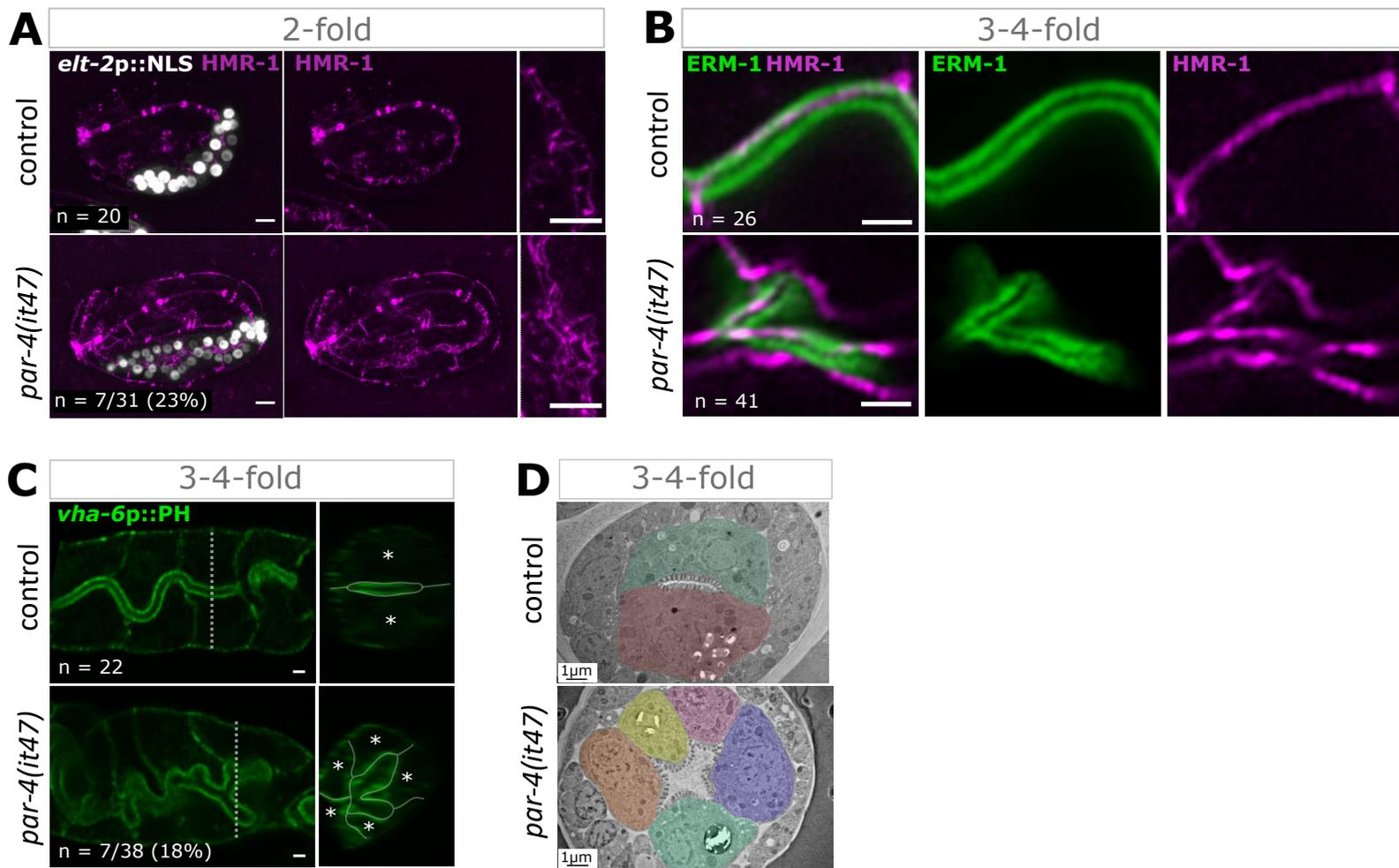
<b>Temperature conditions used before and during experiments</b>	<b>Figures</b>
Strains grown at 15°C, no temperature shift	Fig.S2F
Strains grown at 20°C, no temperature shift For auxin experiments, incubation at 20°C	Fig.1A, Fig.4A Fig.S3A, Fig.S4
Strains shifted at 25°C 2h before starting imaging or fixation (TEM), maintained at 25°C during time-lapse recordings	Fig.1B-F, Fig.2, Fig.3A-B,D, Fig.4B, Fig.5D Fig.S1, Fig.S2A-E, Fig.S3B-D
Strains shifted at 25°C just at the beginning of imaging, maintained at 25°C during time-lapse recordings.	Fig.5B-C
Strains shifted at 25°C 1h before starting imaging, maintained at 25°C during time-lapse recordings	Fig.6, Fig.S5
Strains shifted at 25°C 3h before starting imaging, maintained at 25°C during time-lapse recordings	Fig.3C



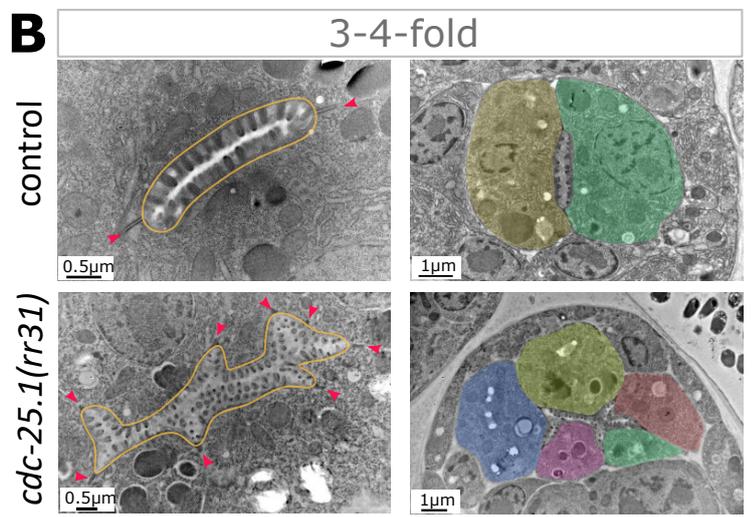
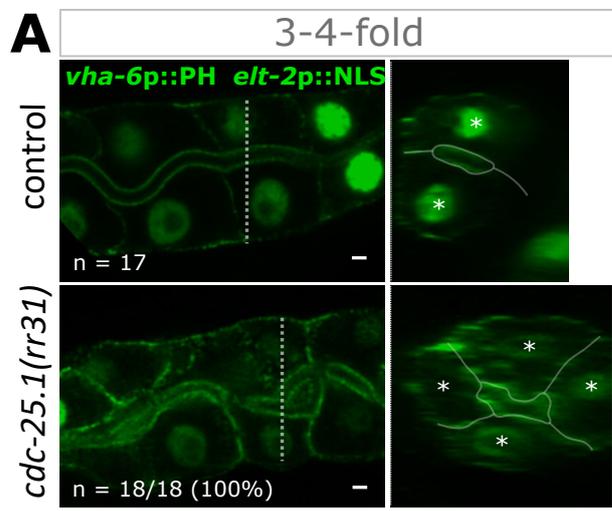
**Figure 1**



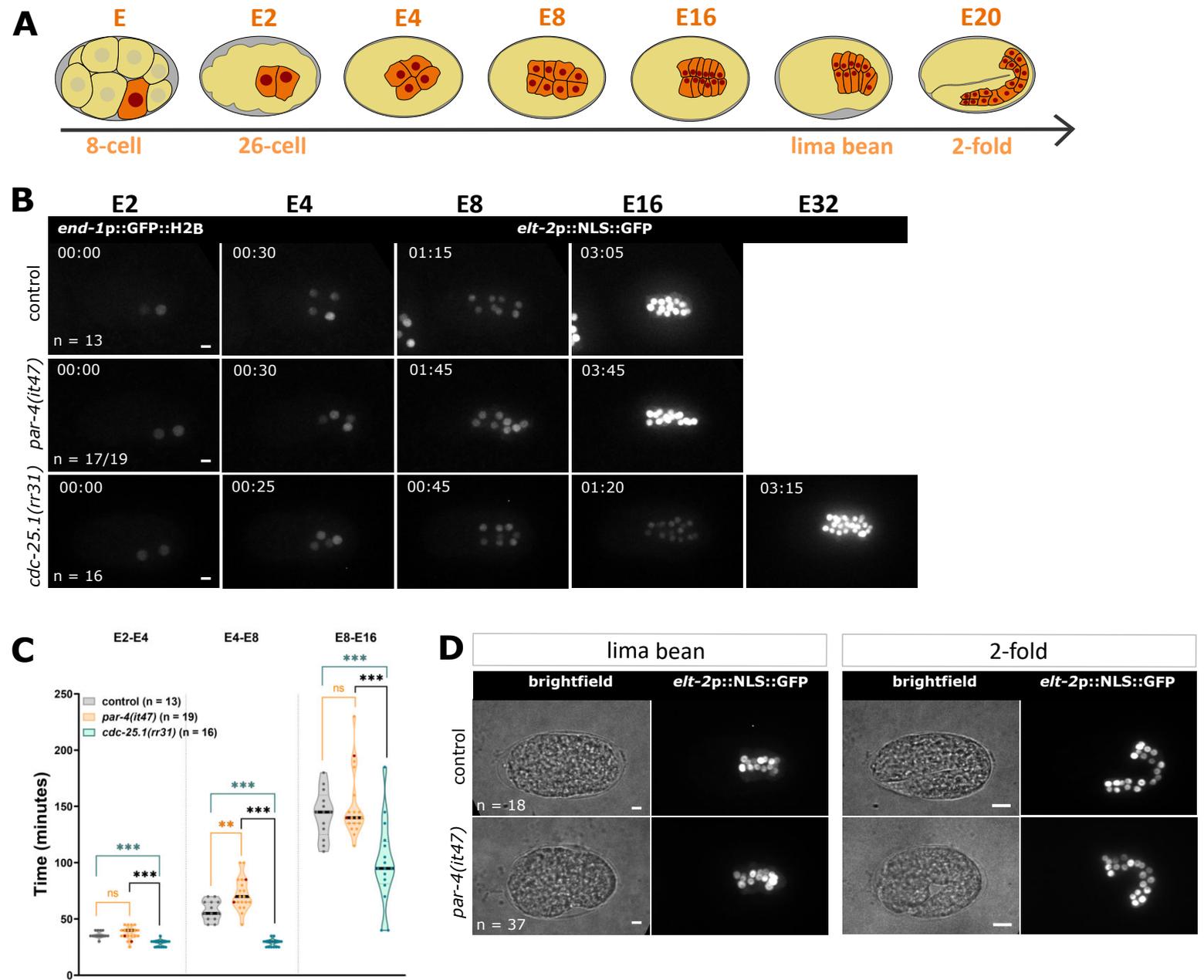
**Figure 2**



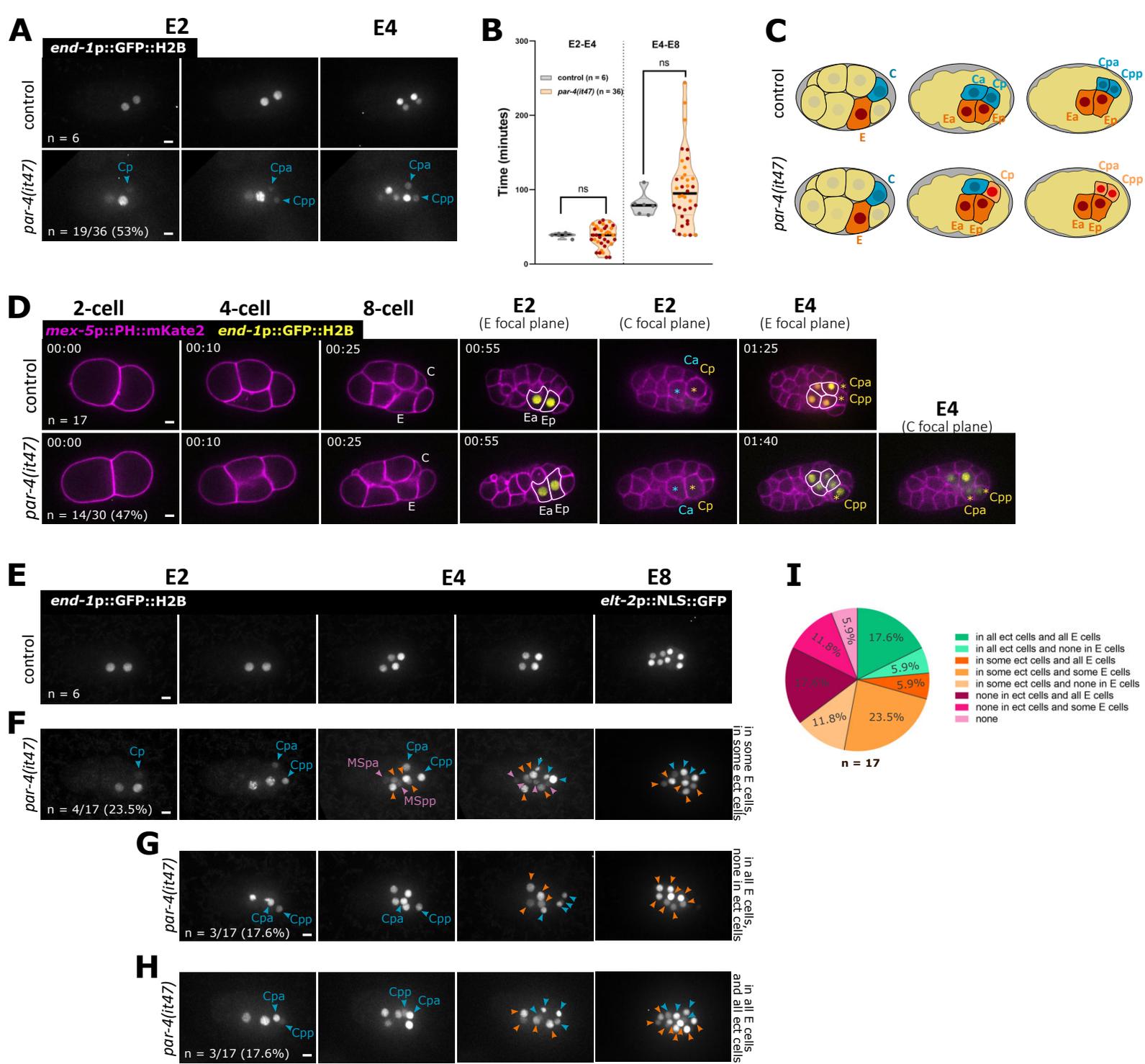
**Figure 3**



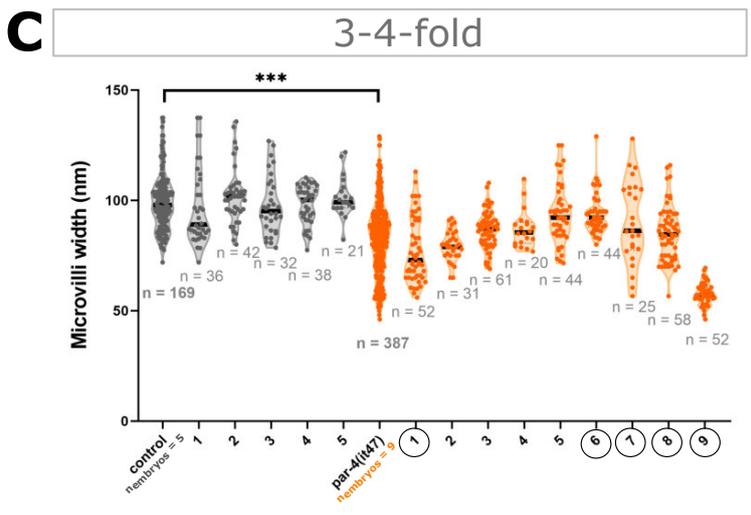
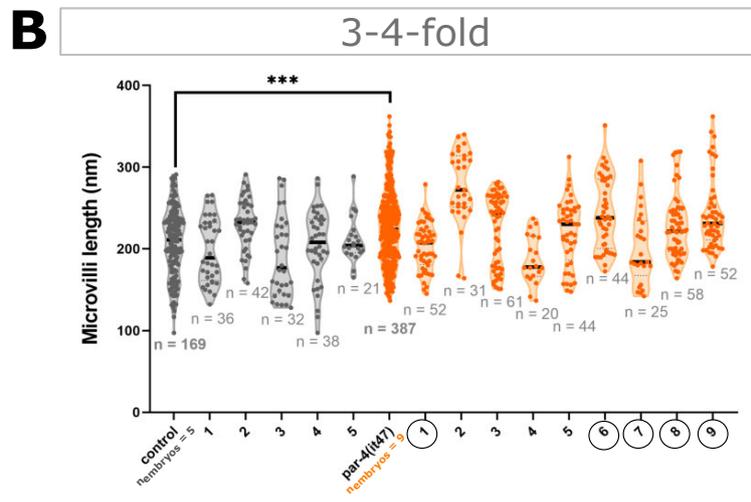
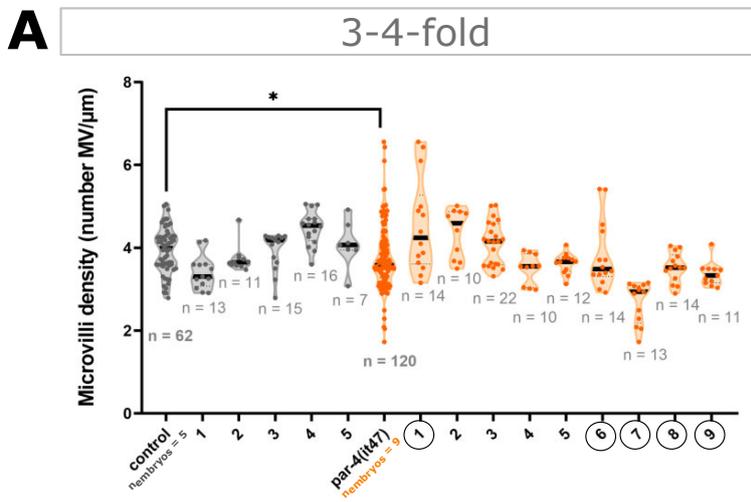
**Figure 4**



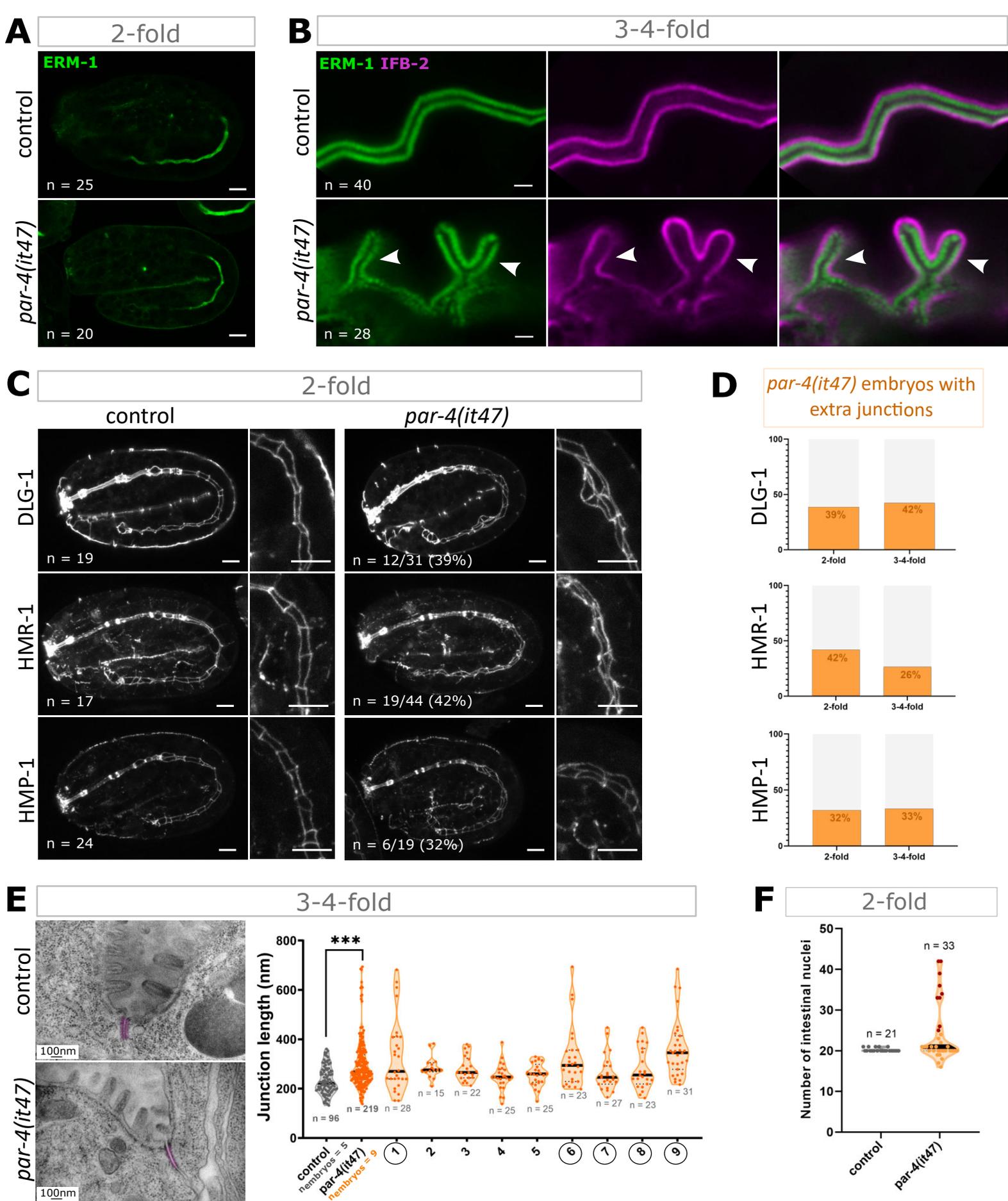
**Figure 5**



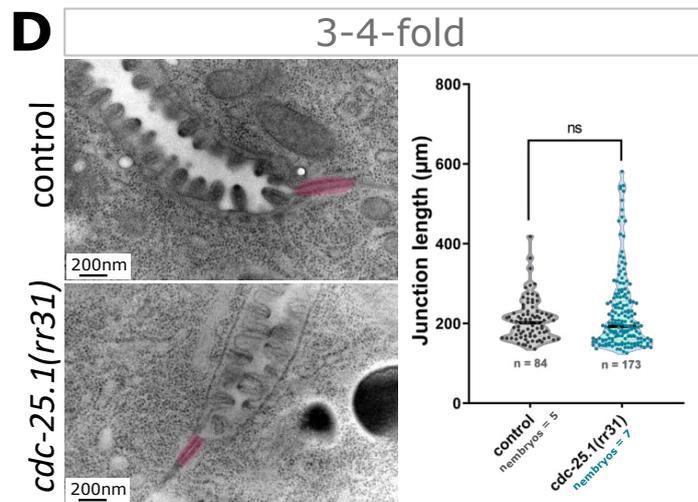
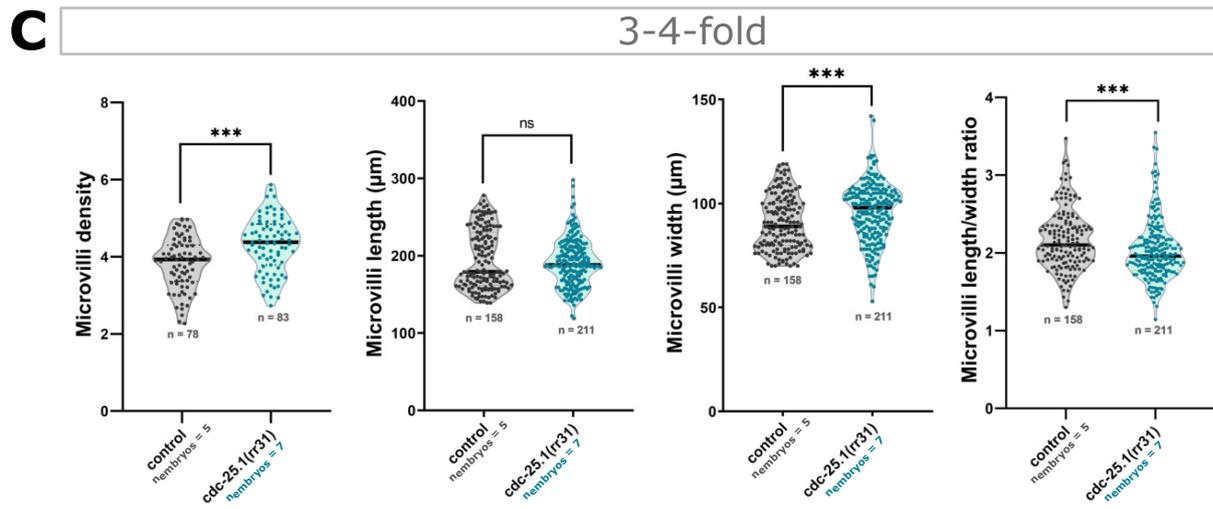
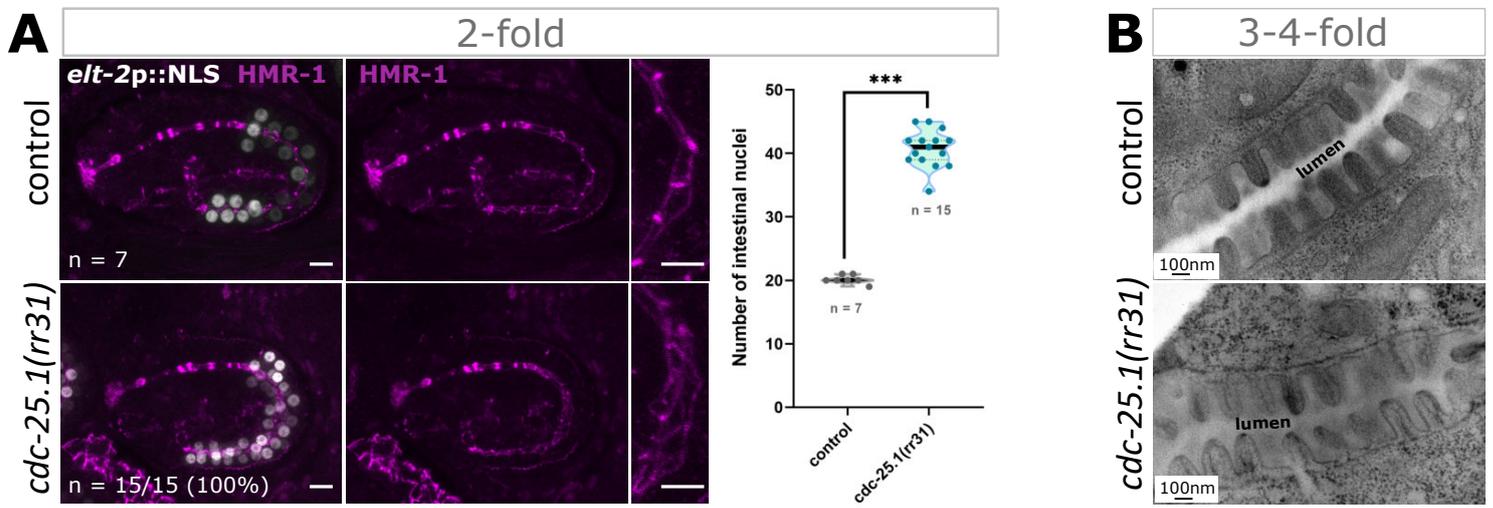
**Figure 6**



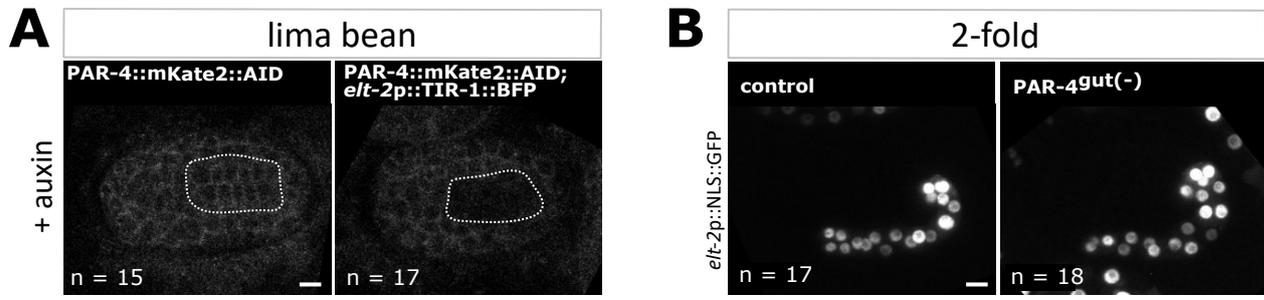
**Figure S1**



**Figure S2**



**Figure S3**



**Figure S4**

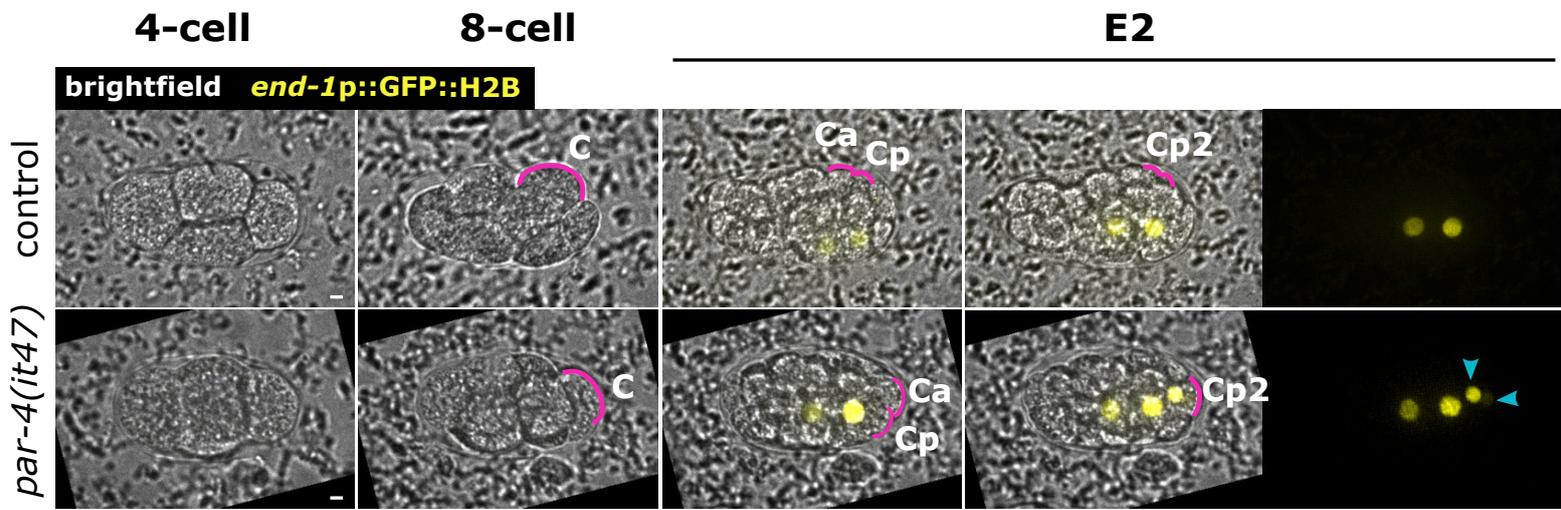


Figure S5

## II. Résultats complémentaires

### Matériel et méthodes

Les souches de vers utilisées ont été cultivées comme décrit précédemment (Brenner 1974), exceptées les souches de vers thermosensibles qui ont été cultivées à la température permissive (15°C). Les vers sont nourris avec des bactéries *E. coli* OP50 ensemencées sur des boîtes contenant du milieu NGM (Nematode Growth Medium : NaCl (3g/L), Bacto-Peptone (2.5 g/L), Bacto-Agar (17 g/L), cholestérol (5 ng/mL), CaCl<sub>2</sub> (1 mM), MgSO<sub>4</sub> (1 mM) et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (25 mM, pH 6)). Lors des expériences d'interférence à l'ARN (ARNi), l'ajout de carbenicilline (50 µg/mL) et d'IPTG (1 mM) permet d'induire la production des ARN double brins par les bactéries.

**Table 1 : Liste des souches utilisées**

Nom	Génotype
FL536	<i>hmr-1(cp57[hmr-1::mKate2]) I; tels46[end-1p::GFP::H2B + unc-119(+)] IV; rrls1[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + unc-119(+)] X</i>
FL582	<i>hmr-1(cp57[hmr-1::mKate2]) I; tels46[end-1p::GFP::H2B + unc-119(+)] IV; par-1(zu310) V; rrls1[elt-2p::NLS::GFP::LacZ::unc-54 3'UTR + unc-119(+)] X</i>
FL646	<i>wls93[med-1p::GFP::med-1+ rol-6(su1006)]; stls10220[end-1p::H1::wCherry + unc-119(+)]</i>
FL648	<i>par-1(zu310) V; wls93[med-1p::GFP::med-1+ rol-6(su1006)]; stls10220[end-1p::H1::wCherry + unc-119(+)]</i>
FL668	<i>par-4(it47) V; wls93[med-1p::GFP::med-1+ rol-6(su1006)]; stls10220[end-1p::H1::wCherry + unc-119(+)]</i>
SYS81	<i>ujls113[pie-1p::mCherry::H2B::pie-1 3'UTR + nhr-2p::mCherry::his-24::let-858 3'UTR + unc-119(+)] II; skn-1(hq82([skn-1::gfp]) IV</i>
FL695	<i>ujls113[pie-1p::mCherry::H2B::pie-1 3'UTR + nhr-2p::mCherry::his-24::let-858 3'UTR + unc-119(+)] II; skn-1(hq82([skn-1::gfp]) IV; par-1(zu310) V</i>
FL696	<i>skn-1(hq82([skn-1::gfp]) IV; stls10220[end-1p::H1::wCherry + unc-119(+)]</i>
FL737	<i>skn-1(hq82([skn-1::gfp]) IV; par-4(it47) V; stls10220 end-1p::H1::wCherry + unc-119(+)]</i>
TX189	<i>unc-119(ed3) III; tels1[oma-1p::oma-1::GFP::oma-1 3'UTR + unc-119(+)]</i>
FL684	<i>par-1(zu310) V; tels1[oma-1p::oma-1::GFP::oma-1 3'UTR + unc-119(+)]</i>
FL685	<i>par-4(it47) V; tels1[oma-1p::oma-1::GFP + unc-119(+)]</i>

### **Interférence à l'ARN ciblant *gsk-3***

La déplétion de GSK-3 a été induite par interférence à l'ARN par la méthode de « feeding ». Pour cela, des larves L1 ont été déposées sur des boîtes NGM avec de l'IPTG (1 mM)ensemencées par des cultures bactériennes L4440 (contrôles) ou *gsk-3(ARNi)*. Les jeunes adultes ont été disséqués 48h après.

### **Passage à 25°C, montage des embryons et observation au microscope**

La souche *par-1(zu310)* porte une mutation ponctuelle dans la région codant pour le domaine kinase de la protéine. Le changement de nucléotide T -> A en position 917 induit un changement de la séquence d'acides aminés en isoleucine -> asparagine (Spilker et al. 2009). Des études suggèrent que l'allèle *par-1(zu310)* induit une perte de fonction après une plus longue durée à la température restrictive (25°C) que d'autres allèles thermosensibles (Spilker et al. 2009). Des jeunes adultes hermaphrodites ont été déposés à 25°C trois heures avant l'observation au microscope afin d'induire la perte de fonction de PAR-1. Pour les expériences concernant la perte de fonction de PAR-4, des jeunes adultes hermaphrodites ont été déposés à 25°C une heure avant l'observation au microscope. Pour les expériences de lignage, après dissection de jeunes adultes hermaphrodites dans du milieu liquide M9, environ une vingtaine d'embryons a été aspirée à l'aide d'un aspire-bouche et d'une pipette pasteur effilée, puis déposée dans une goutte de M9 sur une boîte à fond de verre 35 mm (puits de 14 mm recouvert de poly-D-lysine, verre No 1.5, MatTek). L'excès de milieu M9 a été ensuite aspiré pour maintenir les embryons accrochés au support de lamelle recouvert de poly-D-lysine. Pour sceller le montage et éviter l'évaporation du liquide aqueux, un volume d'environ 2 mL d'huile minérale (Light Oil (neat), Sigma) a été ajouté pour recouvrir la goutte de M9 contenant les embryons. Les embryons ont été filmés au microscope Spinning Disk Leica DMI8 équipé d'un objectif 63x (HCX Plan Apo, 1.4 NA) et d'une caméra de haute sensibilité Roper Evolve EMCCD. Le dispositif était contrôlé par Inscoper Imaging Suite. Les embryons ont été maintenus à 25°C pendant les acquisitions de films. Les images ont été acquises à des intervalles de temps de 3 minutes (fig. 55A,E ; 56A-B) ou 5 minutes (fig. 55B-D). Le pas de z est de 0.4 µm.

Pour les acquisitions en microscopie confocale classique, des embryons exprimant la protéine OMA-1 fusionnée à la GFP, ainsi que des embryons exprimant la protéine SKN-1 fusionnée au locus à la GFP ont été observés. Pour cela, les hermaphrodites adultes sont disséqués sur une lamelle de verre dans une goutte de M9 puis la lamelle est déposée sur un coussin d'agarose 2%. Les embryons ont été observés avec un microscope confocal SP8 (Leica), équipé d'un objectif 63x (HC Plan-Apo, 1.4 NA). Le pas de z est de 0.4 µm.

## La perte de fonction de PAR-1 induit un défaut de spécification similaire à la perte de fonction de PAR-4

Mes résultats de thèse montrent que PAR-4 contrôle la spécification du blastomère C et contribue à empêcher que ce dernier n'adopte une identité intestinale. Nous avons ensuite cherché à caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans la voie de signalisation régulée par PAR-4 dans ce contexte. Il est connu que les protéines PAR-4/LKB1/XEEK1 sont capables de réguler indirectement des processus biologiques tels que la polarité cellulaire, la prolifération cellulaire, l'apoptose ou le métabolisme cellulaire en agissant via des effecteurs dont les mieux décrits sont les protéines kinases AMPK, PAR-1/MARK, PIG-1/MELK et GSK3 $\beta$ . (Amin et al. 2009; Asada and Sanada 2010; Chien et al. 2013; Lin-Marq et al. 2005; Lizcano et al. 2004; Lo et al. 2012; Martin and St Johnston 2003; Ossipova et al. 2003; Tenlen et al. 2008; Wang et al. 2007). Nous avons décidé de tester l'implication de la protéine kinase PAR-1 dans la spécification du blastomère C. Pour cela, nous avons induit la perte de fonction de PAR-1 en utilisant une souche thermosensible nommée *par-1(zu310)* (Kao et al. 2004; Spilker et al. 2009). Pour ces expériences, nous avons déposé les adultes hermaphrodites trois heures à 25°C en amont de l'observation des embryons au microscope. Le gène *end-1* est un des premiers gènes à être exprimés dans les cellules intestinales, indiquant leur spécification intestinale (Zhu et al. 1997). Ainsi, dans un premier temps, nous avons filmé le développement précoce des embryons *par-1(zu310)* exprimant le marqueur nucléaire spécifique des cellules intestinales *end-1p::GFP::H2B* combiné au canal de lumière blanche pour visualiser les blastomères. De manière similaire aux embryons *par-4(it47)*, 35% des embryons *par-1(zu310)* (n = 7/20) présentent des cellules qui expriment ectopiquement le marqueur transcriptionnel *end-1* (**fig. 55A**). Ces cellules proviennent toutes du lignage C et sont identifiées comme étant les cellules filles de la cellule Cp, nommées Cpa et Cpp (**fig. 55A**) (n = 7/7, 100%). Par ailleurs, nous avons occasionnellement observé l'apparition du signal *end-1p::GFP::H2B* également dans le lignage MS, et plus particulièrement dans les cellules filles de la cellule MSp (n = 2/7, 29%). Ces résultats suggèrent que PAR-1, comme PAR-4, est capable de contrôler la spécification du blastomère C et de l'empêcher d'exprimer un marqueur intestinal tel que *end-1*. A noter toutefois, que n'ayant pas effectué de films dans les embryons contrôles dans ces conditions, il sera nécessaire de vérifier l'absence de signal *end-1* dans le blastomère C dans des conditions contrôles.

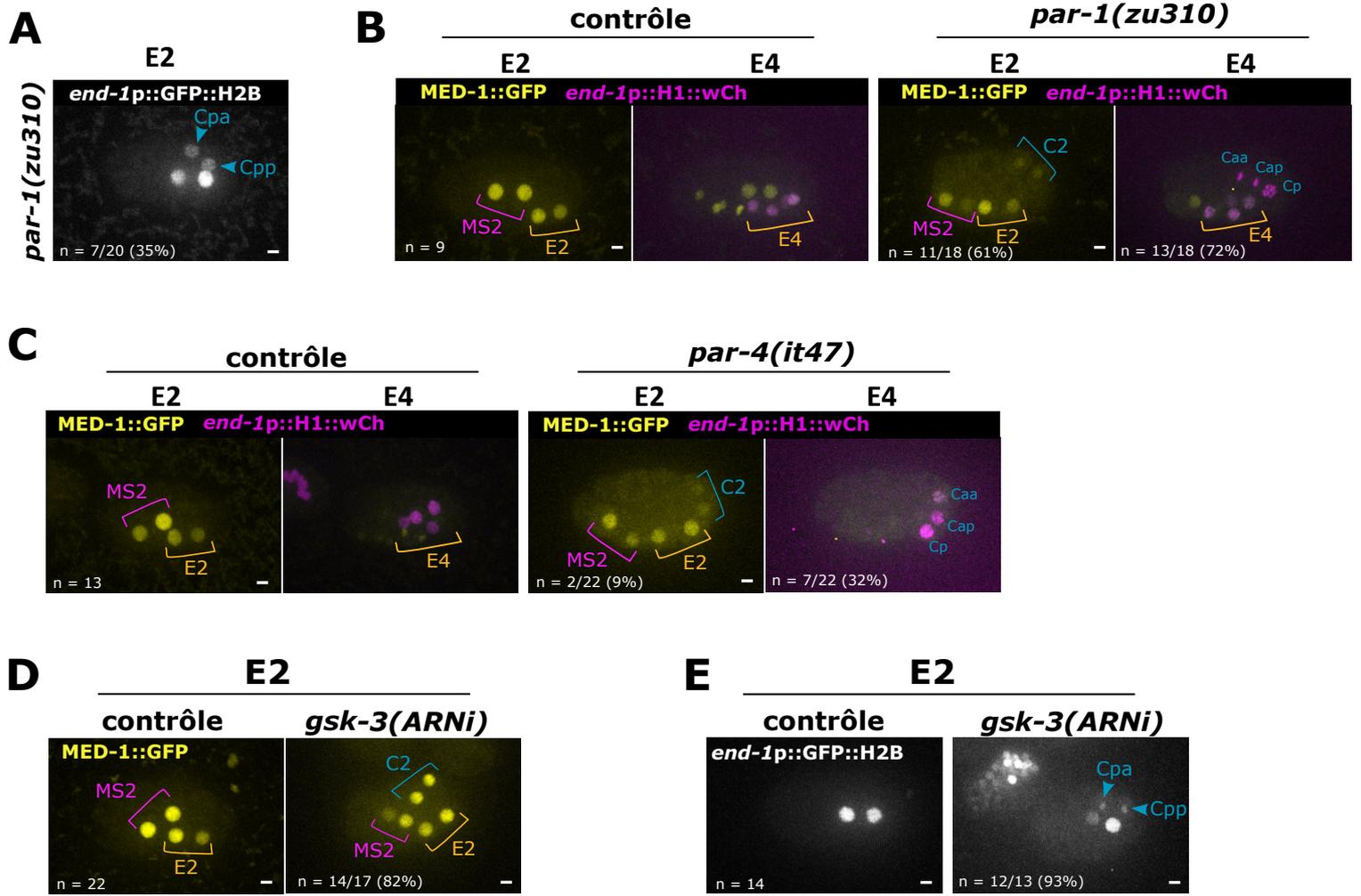


Figure 55

**Figure 55 : PAR-4 et PAR-1 contrôlent le devenir cellulaire du lignage C.**

**(A)** Images tirées de films de lignage d'un embryon *par-1(zu310)* au stade E2 exprimant le marqueur *end-1p::GFP::H2B* dans le lignage E et dans les cellules filles de Cp, Cpa et Cpp (indiquées en bleu). **(B)** Images tirées de films d'embryons contrôle et *par-1(zu310)* exprimant MED-1::GFP (jaune) et le marqueur nucléaire intestinal *end-1p::H1::wCherry* (magenta) aux stades E2 et E4. Dans l'embryon contrôle, ce marqueur est visible dans Ea et Ep (E2, orange) ainsi que dans MSa et MSp (MS2, magenta). Dans l'embryon *par-1(zu310)*, MED-1::GFP est également visible dans Ca et Cp (C2, bleu). **(C)** Images tirées de films d'embryons contrôle et *par-4(it47)* exprimant MED-1::GFP (jaune) et le marqueur nucléaire intestinal *end-1p::H1::wCherry* (magenta) aux stades E2 et E4. Dans l'embryon *par-4(it47)*, MED-1::GFP est exprimé ectopiquement dans Ca et Cp, puis *end-1* est exprimé dans les descendants de C (bleu). Le signal *end-1* est faible dans les descendants de E dans cet embryon. **(D)** Images tirées de films d'embryons contrôle et *gsk-3(ARNi)* exprimant MED-1::GFP au stade E2. **(E)** Images tirées de films de lignage d'embryons contrôle et *gsk-3(ARNi)* au stade E2 exprimant le marqueur *end-1p::GFP::H2B* dans les cellules du lignage E. L'embryon déplété en GSK-3 exprime *end-1* anormalement dans les cellules filles de Cp, Cpa et Cpp (indiquées en bleu). **(A-E)** Projections maximales à un point de temps donné de films. Le nombre d'embryons observés est indiqué sur les images. Barres d'échelle : 5 µm.

**L'expression de *end-1* peut être corrélée à la présence de MED-1 dans les descendants de C dans les embryons *par-1(zu310)* et *PAR-4(it47)***

Chez *C. elegans*, l'expression du gène *end-1* est principalement activée par les facteurs de transcription MED-1,2. Il a été montré qu'une expression ectopique de *end-1* est induite par une expression ectopique de *med-1* (Maduro et al. 2001). Nous avons ainsi émis l'hypothèse que l'expression ectopique de *end-1* pourrait être due à l'expression ectopique de *med-1* dans le lignage C. Pour tester cette hypothèse, nous avons observé le signal de la protéine MED-1 fusionnée à la GFP et sous le contrôle de son propre promoteur dans des embryons exprimant également l'histone H1 fusionnée à wCherry sous le contrôle du promoteur *end-1*. Dans les embryons contrôles, le signal MED-1::GFP devient visible dans les blastomères E et MS avec une intensité faible et persiste dans les descendants de E et MS avec une forte intensité dans les cellules Ea, Ep, MSa et MSp (**fig. 55B**). Dans 61% des embryons *par-1(zu310)* (n = 11/18), MED-1::GFP est exprimée dans des cellules localisées en-dehors des lignages E et MS (**fig. 55B**). Pour la majorité d'entre eux, il s'agit du blastomère C et de ses descendants Ca et Cp qui expriment ectopiquement MED-1::GFP (n = 10/11). Une partie de ces embryons présentent également un signal MED-1::GFP dans le blastomère P3 (n = 5/11). Dans un embryon *par-1(zu310)*, il n'est pas possible d'identifier les cellules qui expriment ectopiquement le transgène. Par la suite, nous avons cherché à explorer la corrélation entre la présence de MED-1 et l'expression de *end-1* dans le lignage C lors de la

perte de fonction de PAR-1. Dans les embryons contrôles, le marqueur *end-1p::H1::wCherry* est visible dans le lignage E, mais également souvent dans les descendants de la cellule MSp (n = 8/9). Cette expression du transgène est amplifiée par le passage à 25°C et empêche toute caractérisation de l'expression de *end-1* dans le lignage MS dans des conditions de perte de fonction. Nous avons remarqué que 72% des embryons *par-1(zu310)* montrent une expression de *end-1* dans des cellules en-dehors du lignage E (n = 13/18, **fig. 55B**). Excepté un embryon, tous les embryons *par-1(zu310)* (91%, n = 10/11) présentant un signal MED-1::GFP en-dehors des lignages E et MS expriment également *end-1* dans ces cellules (**fig. 55B**). Nous avons toutefois remarqué occasionnellement une expression de *end-1* dans le lignage C indépendamment de la présence de MED-1 dans ce même lignage dans les embryons *par-1(zu310)* (n = 2/18). Ainsi, dans les embryons *par-1(zu310)*, il existe une forte corrélation entre la présence ectopique de la protéine MED-1 et l'induction de l'expression de *end-1*.

Par la suite, nous avons commencé à analyser l'expression de ces marqueurs dans les embryons *par-4(it47)*. Nous avons remarqué que 32% des embryons *par-4(it47)* présentent un signal *end-1* dans les cellules Ca et Cp du lignage C (n = 7/22, **fig. 55C**). Toutefois, seulement trois d'entre eux expriment MED-1::GFP dans les cellules Ca et Cp (n = 3/7, **fig. 55C**), et occasionnellement dans la cellule P3 (n = 1/7). Ces résultats préliminaires suggèrent que l'expression de *end-1* dans le lignage C des embryons *par-4(it47)* est en partie activée par la présence anormale de MED-1 dans les descendants de C.

Par ailleurs, nous avons observé que la déplétion de GSK-3 par interférence à l'ARN entraîne l'expression de MED-1::GFP dans les descendants de C (82%, n = 14/17, **fig. 55D**), confirmant les données publiées par d'autres laboratoires (Maduro et al. 2001). Toutefois, de manière surprenante, aucun signal *end-1p::H1::wCherry* n'est visible dans ces embryons *gsk-3(ARNi)* (n = 14/14). Cela diffère des données publiées et de nos observations avec le marqueur *end-1p::GFP::H2B* qui permet de visualiser une expression de *end-1* dans le lignage C dans 93% des embryons *gsk-3(ARNi)* (n = 12/13, **fig. 55E**) (Maduro et al. 2001).

### **PAR-1 et PAR-4 ne semblent pas contrôler la stabilisation de la protéine SKN-1 dans le blastomère C**

De nombreuses études montrent que la voie de signalisation majeure impliquée dans la spécification de l'endoderme pour *in fine* réguler l'expression du gène *end-1* correspond au facteur de transcription SKN-1 qui active l'expression de *med-1* (Broitman-Maduro, Maduro, and Rothman 2005; Goszczynski and McGhee 2005; Maduro et al. 2001, 2007, 2015). Par ailleurs, une stabilisation anormale

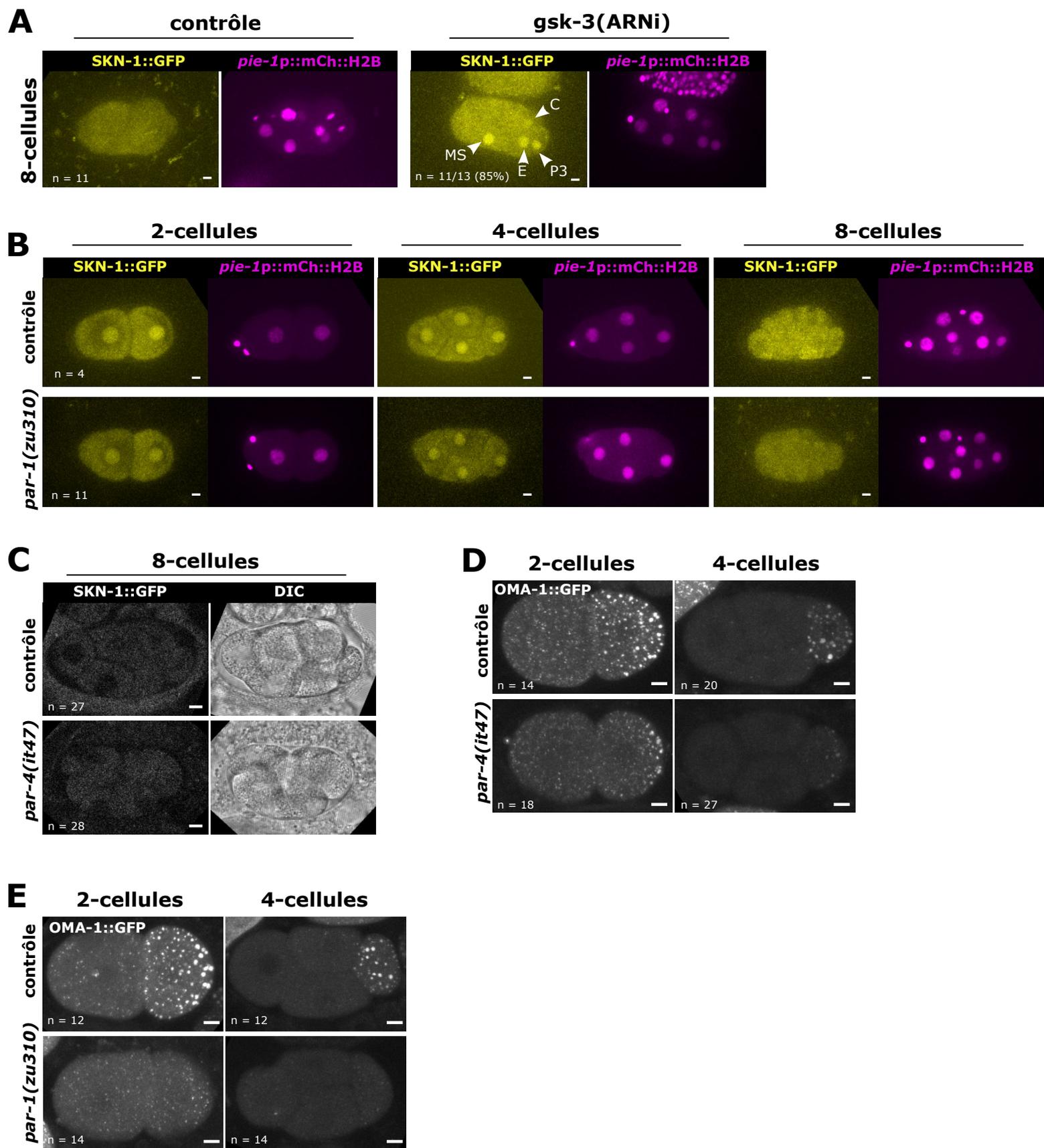


Figure 56

**Figure 56 : Les pertes de fonctions de PAR-4 et PAR-1 ne semblent pas induire de stabilisation protéique de SKN-1.**

**(A-B)** Projections maximales à un point de temps donné de films. **(A)** Images tirées de films de lignage d'un embryon contrôle et *gsk-3(ARNi)* au stade 8-cellules exprimant la protéine SKN-1::GFP ainsi que le marqueur nucléaire *pie-1p::mCherry::H2B*. Dans un embryon contrôle, SKN-1 n'est plus détectée au stade 8-cellules. Au contraire, dans un embryon déplété en GSK-3, SKN-1 est stabilisée dans les blastomères MS, E, P3 et C (flèches blanches). **(B)** Images tirées de films d'embryons contrôle et *par-1(zu310)* exprimant SKN-1::GFP et *pie-1p::mCherry::H2B*. Dans un embryon contrôle, SKN-1 est enrichie dans les noyaux de AB et P1 au stade 2-cellules ainsi que dans les noyaux de ABa, ABp, EMS et P2 au stade 4-cellules ; le signal SKN-1::GFP n'est plus détecté au stade 8-cellules. Les embryons *par-1(zu310)* présentent la même distribution de SKN-1 aux stades 2-, 4- et 8-cellules, avec également une absence de détection du signal SKN-1::GFP au stade 8-cellules. **(C)** Images d'un plan focal d'embryons au stade 8-cellules contrôle et *par-4(it47)* exprimant SKN-1::GFP associé au canal du DIC permettant de visualiser les cellules par contraste. Au stade 8-cellules, le signal SKN-1::GFP n'est pas détecté, que ni dans les embryons contrôles, ni dans les embryons *par-4(it47)*. **(D,E)** Projections maximales d'embryons contrôles, *par-4(it47)* (D) et *par-1(zu310)* (E) aux stades 2-cellules et 4-cellules. Dans les embryons contrôles, l'intensité du signal OMA-1::GFP décroît rapidement au cours des premières divisions. Dans les embryons *par-4(it47)* et *par-1(zu310)*, aucune stabilisation de OMA-1 n'est observée, avec au contraire une intensité de signal en moyenne plus faible par rapport aux contrôles. **(A-E)** Le nombre d'embryons observés est indiqué sur les images. Barres d'échelle : 5 µm.

de SKN-1 dans le blastomère C est capable d'induire l'expression de *med-1* dans ce lignage (Lin 2003; Maduro et al. 2001). Nous avons donc cherché à caractériser l'effet de la perte de fonction de PAR-1 sur la stabilisation de SKN-1 dans les blastomères embryonnaires. Pour cela, nous avons observé la dynamique de la protéine SKN-1 endogène marquée au locus par la GFP dans des embryons qui expriment également l'histone H2B fusionnée à la mCherry sous le contrôle du promoteur *pie-1* qui marque tous les noyaux des cellules embryonnaires. Dans les embryons contrôles, le signal SKN-1::GFP visible dans les noyaux de AB et P1 au stade 2-cellules, puis dans ceux de ABa, ABp, EMS et P2 au stade 4-cellules (n = 4, **fig. 56B**). La protéine SKN-1::GFP n'est plus détectée au stade 8-cellules (**fig. 56B**). Au contraire de ce qui a été décrit précédemment via des expériences d'immunomarquage, nous n'avons pas remarqué d'enrichissement asymétrique systématique de la protéine SKN-1 endogène au cours de l'embryogenèse précoce (Bowerman et al. 1993). Afin de déterminer si une stabilisation de SKN-1 peut être détectée en observant ce marqueur fluorescent endogène, nous avons observé des embryons déplétés en GSK-3 dont le phénotype a été décrit (Maduro et al. 2001; Shirayama et al. 2006). De manière cohérente aux données déjà publiées, nous avons confirmé que 85% des embryons déplétés en GSK-3 montrent une stabilisation de la protéine SKN-1 dans le blastomère C mais aussi dans le blastomère P3 (n = 11/13, **fig. 56A**). En revanche, les embryons *par-1(zu310)* présentent une distribution très similaire aux embryons contrôles aux stades 2-cellules, 4-cellules et 8-cellules (n = 11, **fig. 56B**). Pour compléter l'étude, nous avons

également observé le signal SKN-1::GFP dans une autre souche exprimant également le marqueur membranaire de toutes les cellules de l'embryon (*mex-5p::PH::mKate2*). Le profil de distribution de SKN-1::GFP est similaire entre les embryons contrôles (n = 11) et les embryons *par-1(zu310)* (n = 15, données non montrées). Ces résultats suggèrent que l'expression de *end-1* dans le blastomère C induite par la perte de fonction de PAR-1 est activée de manière indépendante à SKN-1 mais dépendante de MED-1.

Afin de tester si PAR-4 agit via la stabilisation de SKN-1 pour réguler la spécification du blastomère C, nous avons observé SKN-1::GFP dans des embryons aux stades 8-12-cellules. Comme pour les embryons contrôles (n = 27), la protéine SKN-1::GFP n'est pas détectée dans les embryons *par-4(it47)* (n= 28, **fig. 56C**). Ces résultats suggèrent que la perte de fonction de PAR-4 n'influence pas la stabilisation protéique de SKN-1. Ainsi, PAR-4 pourrait agir sur l'expression de *end-1* indépendamment de SKN-1, et partiellement via MED-1.

Par ailleurs, avant d'avoir remarqué que SKN-1 n'est pas stabilisée dans les embryons *par-4(it47)*, nous avons émis l'hypothèse que la perte de fonction de PAR-4 pourrait entraîner la stabilisation de la protéine OMA-1, elle-même impliquée dans la stabilisation de SKN-1. En effet, les embryons mutants gain de fonction pour OMA-1 présentent une protéine SKN-1 stabilisée dans les blastomères C et P3 (Lin 2003). De plus, la déplétion de GSK-3, qui présente un phénotype de spécification intestinale similaire aux embryons *par-4(it47)* et *par-1(zu310)* empêche la dégradation de OMA-1 ce qui induit la stabilisation anormale de SKN-1 dans le blastomère C (Nishi and Lin 2005; Shirayama et al. 2006). Ainsi, nous avons testé si PAR-4 et PAR-1 sont impliquées dans la dégradation de OMA-1. Pour cela, nous avons observé des embryons exprimant la protéine OMA-1 fusionnée à la GFP aux stades 2-cellules et 4-cellules. Dans les embryons contrôles, les niveaux protéiques de OMA-1 diminuent rapidement au cours des premières divisions embryonnaires (**fig. 56D-E**). De façon similaire aux embryons contrôles, les embryons *par-4(it47)* et *par-1(zu310)* présentent une diminution des niveaux protéiques de OMA-1 au stade 4-cellules par rapport au stade 2-cellules (**fig. 56D-E**). Nous avons par ailleurs noté un signal OMA-1::GFP en moyenne plus faible dans les embryons *par-4(it47)* et *par-1(zu310)* par rapport aux embryons contrôles, confirmant des observations dans les embryons *par-1(zu310)* précédemment publiées (Shirayama et al. 2006). Ainsi, les pertes de fonction de PAR-4 et PAR-1 n'empêchent pas la dégradation de OMA-1. Ces résultats sont cohérents avec nos observations décrites ci-dessus et suggérant que l'expression de *end-1* et de *med-1* dans les descendants de C est indépendante de la stabilisation de SKN-1 dans les embryons *par-4(it47)* et *par-1(zu310)* (**fig. 56D-E**).

Pour ces résultats complémentaires, Anne Pacquelet a effectué les acquisitions en microscopie confocale classique (**fig. 56C-E**). J'ai généré l'ensemble des autres résultats.

### III. Contribution à un article

#### “High-resolution dynamic mapping of the *C. elegans* intestinal brush border”

(Bidaud-Meynard et al. 2021)

Au cours de ma thèse, j’ai contribué à une étude réalisée au sein de l’équipe avec Aurélien Bidaud-Meynard en premier auteur et Anne Pacquelet, Ophélie Nicolle et moi-même en co-deuxièmes autrices. L’objectif de cette étude était de caractériser la localisation de différents composants de la bordure en brosse (ACT-5, IFB-2 et des protéines interagissant avec l’actine) à différents stades du développement intestinal. Ma contribution a consisté à observer les marqueurs ERM-1 et MLC-5 depuis le stade E16 jusqu’au dernier stade larvaire/jeunes adultes. Pour cela, nous avons utilisé un mode d’acquisition au microscope qui permet de compter les photons et permet ainsi la quantification de l’expression des marqueurs au cours de l’embryogenèse et de la vie larvaire. L’acquisition a été effectuée avec un nombre variable d’accumulations adapté à l’intensité des signaux. Par la suite, nous avons quantifié les signaux manuellement en traçant des lignes le long de la membrane apicale. Enfin, les valeurs d’intensité de signal ont été normalisées par rapport à l’expression maximale de chaque marqueur.

Cette étude a montré qu’un ensemble de marqueurs étaient déjà enrichis à la membrane apicale au stade lima bean, avant la formation des microvillosités. Il s’agit des protéines PLST-1, FLN-2, ERM-1, ACT-5 et IFB-2. Par la suite, la localisation apicale de ces marqueurs ainsi que celle de EPS-8, HUM-5 et MLC-5 augmente drastiquement lors de la formation des microvillosités à partir du stade 1.5-fold. L’accumulation apicale précoce de certains facteurs pourrait refléter leur importance pour la formation des microvillosités. Ceci serait cohérent avec le fait que ERM-1 et ACT-5 soient nécessaires pour ce processus (Gobel *et al.*, 2004 ; MacQueen *et al.*, 2005). Comme PLST-1 s’accumule avant la formation des microvillosités, cette protéine pourrait jouer un rôle dans la croissance initiale des protrusions apicales. En outre, alors que la plupart des composants de la bordure en brosse s’accumule progressivement à la membrane apicale pendant l’embryogenèse, FLN-2 présente un profil d’expression particulier. La protéine s’enrichit fortement au pôle apical au stade 2-fold, puis son expression diminue, suggérant un rôle spécifique dans l’établissement des microvillosités (Bidaud-Meynard *et al.*, 2021).

Ainsi, il existerait plusieurs complexes protéiques relatifs aux différentes étapes depuis la croissance jusqu’à la maturation des microvillosités apicales. Avant la croissance des protrusions, un

« module pré-formation » composé au moins des protéines ERM-1, ACT-5, PLST-1, FLN-2 et IFB-2 s'enrichit au pôle apical dès le stade lima bean. Par la suite, un « module d'assemblage » constitué additionnellement de EPS-8, HUM-5 et MLC-5 apparaît au stade 1.5-fold à la membrane apicale dans le but de former les microvillosités. Enfin, un « module mature » qui ne requiert pas FLN-2 persisterait depuis la fin de l'embryogenèse jusqu'à la vie larvaire et adulte. Par ailleurs, la localisation fine des protéines apicales évolue lors de la formation des microvillosités. Dans les larves et adultes, lorsque les microvillosités sont matures et fonctionnelles, EPS-8 est localisée à leur pointe, ERM-1 tout le long des protrusions tandis que IFB-2 est enrichi dans l'endotube en subapical. Au stade 2-fold, IFB-2 a déjà adopté sa localisation subapicale finale. Toutefois, ERM-1 et EPS-8 ne sont pas encore correctement organisées au sein des microvillosités, qui ne sont qu'en formation à ce stade.

# High-resolution dynamic mapping of the *C. elegans* intestinal brush border

Aurélien Bidaud-Meynard<sup>1,\*</sup>, Flora Demouchy<sup>1,\*</sup>, Ophélie Nicolle<sup>1,\*</sup>, Anne Pacquelet<sup>1,\*</sup>, Shashi Kumar Suman<sup>2</sup>, Camille N. Plancke<sup>2</sup>, François B. Robin<sup>2</sup> and Grégoire Michaux<sup>1,†</sup>

## ABSTRACT

The intestinal brush border is made of an array of microvilli that increases the membrane surface area for nutrient processing, absorption and host defense. Studies on mammalian cultured epithelial cells have uncovered some of the molecular players and physical constraints required to establish this apical specialized membrane. However, the building and maintenance of a brush border *in vivo* has not yet been investigated in detail. Here, we combined super-resolution imaging, transmission electron microscopy and genome editing in the developing nematode *Caenorhabditis elegans* to build a high-resolution and dynamic localization map of known and new brush border markers. Notably, we show that microvilli components are dynamically enriched at the apical membrane during microvilli outgrowth and maturation, but become highly stable once microvilli are built. This new toolbox will be instrumental for understanding the molecular processes of microvilli growth and maintenance *in vivo*, as well as the effect of genetic perturbations, notably in the context of disorders affecting brush border integrity.

**KEY WORDS:** Brush border, Intestine, Microvilli, Polarity

## INTRODUCTION

Intestinal microvilli are essential for nutrient absorption. They are organized into a well-ordered and tightly packed array by F-actin crosslinking and bundling factors, such as villin, espin and plastin 1 (also known as fimbrin) (Sauvanet et al., 2015). Recent studies in epithelial cell lines have identified new functional players, such as IRTKS (also known as Baiap211) and myosin 1a/6/7b (Crawley et al., 2014a; Postema et al., 2018), and new mechanisms of brush border assembly and maintenance by vesicular trafficking (Vogel et al., 2015), microvilli motility, contraction and clustering (Meenderink et al., 2019; Chinowsky et al., 2020) or intermicrovillar protocadherin bridges (Crawley et al., 2014b). Additionally, live imaging has revealed some of the key initiation and maturation steps of microvilli biogenesis in cell lines (Gaeta et al., 2021). However, a description of brush border formation and maintenance *in vivo* is lacking.

*Caenorhabditis elegans* has been widely used as an *in vivo* model of intestinal luminogenesis, polarity and host defense (Zhang et al., 2013; Zhang and Hou, 2013; Sato et al., 2014). Intestinal organogenesis encompasses cell division and intercalation steps from the E blastomere to generate 20 perennial cells arranged into nine rings forming an ellipse-shaped tube that runs along the body of the worm (Leung et al., 1999; Asan et al., 2016). Cell polarization begins at the E16 stage with cellular component relocalization and cell shape changes (Leung et al., 1999), as well as apical accumulation of the polarity determinant PAR-3, which recruits the other members of the PAR module (Feldman and Priess, 2012; Achilleos et al., 2010). Luminogenesis occurs concomitantly with the formation of apical cavities at the midline that ultimately form a lumen (Leung et al., 1999). *C. elegans* enterocytes display a brush border that is structurally similar to that of mammals (Leung et al., 1999; Geisler et al., 2019; Bidaud-Meynard et al., 2019): microvilli are made of F-actin core bundles, notably the intestinal-specific actin isoform *act-5*, depletion of which results in a circular lumen with sparse and defective microvilli (MacQueen et al., 2005). Several F-actin regulators are essential for *C. elegans* brush border integrity, including ERM-1, the Ezrin/Radixin/Moesin only ortholog (Gobel et al., 2004; Van Furden et al., 2004), and the actin-capping factor EPS-8 (Croce et al., 2004). As in mammals, microvilli are anchored on a terminal web composed of a network of F-actin and an endotube made of intermediate filaments, in which IFB-2 plays a major role (Geisler et al., 2020; Bossinger et al., 2004). Here, we combined super-resolution and quantitative live microscopy, transmission electron microscopy (TEM) and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) data to characterize the recruitment and dynamics of endogenously tagged markers during the establishment of the *C. elegans* brush border. In particular, we show that intestinal microvilli form and grow throughout embryonic and larval development but are highly stable once formed.

## RESULTS AND DISCUSSION

### TEM analysis of brush border establishment in the *C. elegans* developing embryo

We first characterized the assembly of the brush border during *C. elegans* development by TEM (Nicolle et al., 2015). *C. elegans* embryonic morphogenesis is staged according to the shape and elongation of the embryo, passing through ‘lima bean’ [360 min post-fertilization (mpf)] and ‘comma’ (430 mpf) stages, after which embryos elongate and fold one and a half (460 mpf), two (490 mpf), three (550 mpf) and four times before hatching (L1 stage, 840 mpf). Adulthood is then reached after three consecutive molts, defining the L2 [~21 h post-fertilization (hpf)], L3 (~29 hpf) and L4 (~39 hpf) larval stages (Altun and Hall, 2009). We observed that the intestinal lumen starts to open at the comma stage and progressively expands to reach an elliptical shape in larvae

<sup>1</sup>Université de Rennes, CNRS, IGDR (Institut de Génétique et Développement de Rennes) - UMR 6290, F-35000 Rennes, France. <sup>2</sup>Sorbonne Université, Institut Biologie Paris Seine, CNRS UMR7622, Developmental Biology Laboratory, Inserm U1156, F-75005 Paris, France.

\*These authors contributed equally to this work

†Author for correspondence (gmichaux@univ-rennes1.fr)

ORCID A.B., 0000-0003-0103-3827; F.D., 0000-0001-5162-9974; A.P., 0000-0001-5923-4619; F.B.R., 0000-0002-2420-2593; G.M., 0000-0003-1222-5461

(Fig. 1A,B). The first microvilli-like membrane extensions were observed at the 1.5-fold stage and started to cover the apex with a disorganized pattern at the 2.5-fold stage, to finally form a regular brush border from the 3-fold stage (Fig. 1A). Measurements suggested a relatively continuous increase in microvilli density, length and width (Fig. 1A-E, Fig. S1A-C), implying a gradual maturation of the brush border and *de novo* growth of microvilli throughout development to fill in the membrane added during intestinal surface expansion (Fig. 1A, arrows). Finally, transversal imaging of the brush border allowed measurement of the distance between microvilli edges and centers ( $76.0 \pm 1.1$  nm and  $203.2 \pm 2.0$  nm, respectively) (Fig. 1F,G).

### Dynamic recruitment of brush border components during *C. elegans* development

Expression profiling in mammalian enterocytes between the proliferative crypt and the terminally differentiated villus demonstrated a marked upregulation of actin cytoskeleton-related genes, including actin, ezrin, villin and espin (Chang et al., 2008; Mariadason et al., 2005). Notably, recent data in LLC-PK1 cells showed a stepwise recruitment of EPS8 and IRTKS first, and then ezrin, during microvilli outgrowth (Gaeta et al., 2021). To perform a similar analysis, we systematically investigated the expression and apical localization of endogenously tagged new and known brush border markers.

Although the ortholog of villin is not localized at the brush border (Hunt-Newbury et al., 2007) and espin does not have a *C. elegans* ortholog, we found that PLST-1, the ortholog of plastin 1/fimbrin (Fig. 2A, Fig. S2), one of the major F-actin organizing factors in mammalian brush borders (Crawley et al., 2014a), was apically localized. Second, the F-actin cross-linker FLN-2 (the ortholog of filamin A), which has been proposed to control brush border maintenance in mammalian models (Zhou et al., 2014), was also observed at the enterocyte apical membrane (Fig. 2B, Fig. S2).

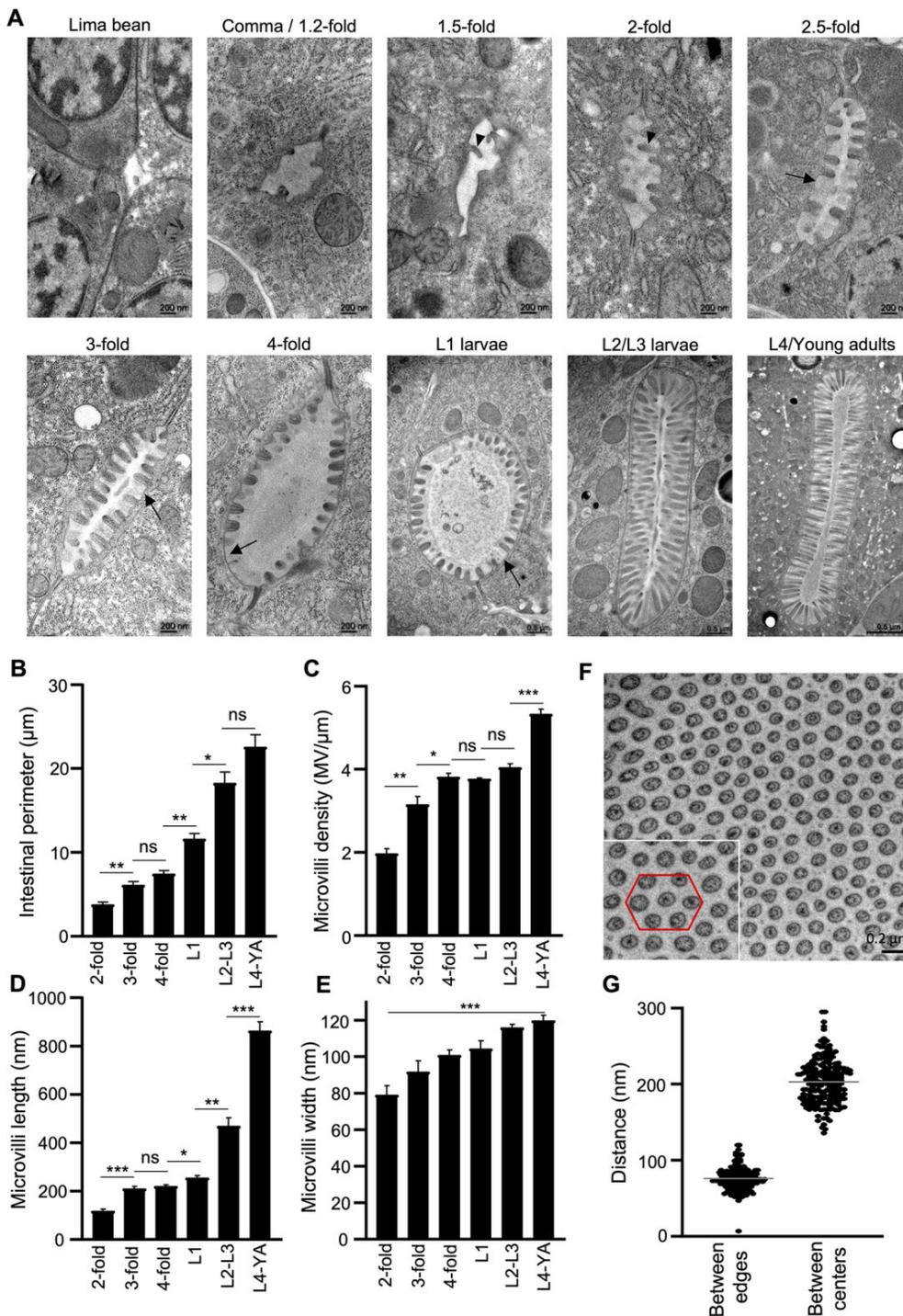
In addition, many members of the myosin superfamily of actin motors have been localized to the brush border in mammalian cells (McConnell et al., 2011; Sauvanet et al., 2015). This superfamily comprises 12 classes of conventional and unconventional myosins, which function as multimers of heavy and light chains (Fili and Toseland, 2019). In the brush border, they have been shown to fulfil structural (e.g. MYO7b, MYH14), trafficking (e.g. MYO-1a, -6) or contractile (non-muscle myosin NM2C) functions (Houdusse and Titus, 2021; Chinowsky et al., 2020). We found that a specific set of myosins accumulates at the enterocyte apex throughout *C. elegans* development: (1) the unconventional heavy chain HUM-5 (the ortholog of human MYO1d/g), which is also localized at the lateral membrane (Fig. 2C, Fig. S2), but not the other members of this class, HUM-1 and HUM-2 (Fig. S3A,B); (2) the essential myosin light chain MLC-5 (Gally et al., 2009) (the ortholog of human MYL1/6) accumulated at the apical membrane in both embryos and larvae (Fig. 2D, Fig. S2), whereas MLC-4 was only weakly expressed in embryos (Fig. S3C). Interestingly, we found that NMY-1 and NMY-2 (the orthologs of the non-muscle myosins NM2A/B and NM2B/C, respectively) (Fig. S3D,E), did not accumulate apically, or accumulated only very weakly, which indicates that myosin-dependent contractility may be less crucial for microvilli assembly in *C. elegans* than in mammals (Chinowsky et al., 2020). These results suggest species-specific mechanisms or compensation between myosins, as shown before (Houdusse and Titus, 2021), and the need for systematic approaches to characterize better the components of brush borders, for instance to identify putative protocadherin-based intermicrovillar bridges molecules

(Crawley et al., 2014b) among the various cadherin-like proteins in the *C. elegans* genome (Loveless and Hardin, 2012).

To assess quantitatively the expression of these apically enriched factors during brush border establishment, we used photon counting detectors and quantified the absolute apical signal of endogenously tagged proteins throughout *C. elegans* development (Fig. 2S, Figs S2, S3F). We observed that a set of markers was already localized at the apical membrane at the lima bean stage, before microvilli onset: PLST-1, FLN-2, ERM-1 and ACT-5 (note that ACT-5 was exogenously expressed under its own promoter, because of the embryonic lethality of endogenously tagged strains), as well as the intermediate filament IFB-2, which appears slightly later (Fig. 2E-J, Fig. S2). Then, we observed that the apical localization of these markers, as well as that of EPS-8, HUM-5 and MLC-5, dramatically increased concomitantly with microvilli assembly (from the 1.5-fold stage), and that most of them peaked between the 4-fold and L1 stages to then decrease until adulthood (Fig. 2K-S, Fig. S2). The early apical accumulation of some of these factors might reflect their importance for microvilli assembly, which is consistent with the requirement of ERM-1 and ACT-5 (Gobel et al., 2004; MacQueen et al., 2005) and the direct relationship between G-actin apical availability and microvilli growth (Faust et al., 2019). As PLST-1 accumulated before microvilli onset, it could also play a role in microvilli initial assembly *in vivo*, which is coherent with the disorganized terminal web and microvilli rootlets described in *Pls1* knockout mice (Grimm-Gunter et al., 2009), despite no obvious defect in *plst-1 C. elegans* mutants at larval stages (Fig. S3G). Interestingly, we observed that FLN-2 displayed a shifted pattern, with an early peak that may suggest a specific role in microvilli establishment. Thus, an evolving set of factors might control microvilli building in *C. elegans*: a ‘pre-assembly module’, composed, at least, of ERM-1, ACT-5, PLST-1, FLN-2 and IFB-2; an ‘assembly module’, composed additionally of EPS-8, HUM-5 and MLC-5, and, finally, a ‘mature module’ that does not require FLN-2 (Fig. S5B).

### Super-resolution imaging of the brush border *in vivo*

According to the Rayleigh criterion ( $R_{\text{fluo}} = \frac{1.22}{2 \times \text{NA}}$ ), the optical axial resolution of the 405, 488 and 561 nm lasers is 176.5, 212.6 and 244.4 nm, respectively, using an NA1.4 objective, which is above the limit to resolve individual microvilli ( $\sim 100$  nm between edges, Fig. 1E,G). To test this, we endogenously tagged ERM-1 with three different fluorophores: Blue Fluorescent Protein (mTagBFP2/BFP,  $\lambda_{\text{ex}} 381$  nm/ $\lambda_{\text{em}} 445$  nm) (Subach et al., 2011), mNeogreen (mNG,  $\lambda_{\text{ex}} 506$  nm/ $\lambda_{\text{em}} 517$  nm) (Shaner et al., 2013) and wrmScarlet (wSc,  $\lambda_{\text{ex}} 569$  nm/ $\lambda_{\text{em}} 593$  nm) (El Mouridi et al., 2017) and imaged them with a multi-detector and deconvolution-based super-resolution imaging system (see Materials and Methods). We could visualize the regular alignment of microvilli with BFP and mNG tags, but it was less visible with the wSc fluorophore (Fig. 3A,B). In addition to individual microvilli, we could also precisely localize brush border markers along the microvilli long axis. Indeed, whereas ERM-1 covered the whole microvilli length, the chloride intracellular channel 2 (CLIC-2) ortholog EXL-1 (Liang et al., 2017) accumulated at the tip of microvilli (Fig. 3C) and the P-GlycoProtein related transporter PGP-1 at their base (Bidaud-Meynard et al., 2019). Of note, this method allowed us to uncover localization differences between in-locus mNG-tagged and overexpressed GFP-tagged proteins (compare Fig. 3C with Fig. S4A), as already reported for E-cadherin in the same tissue (Cordova-Burgos et al., 2021).



**Fig. 1. TEM analysis of the brush border.** (A) Representative TEM images of *C. elegans* intestinal lumen at the developmental stages indicated. Arrowheads indicate nascent microvilli; arrows indicate empty spaces between microvilli.

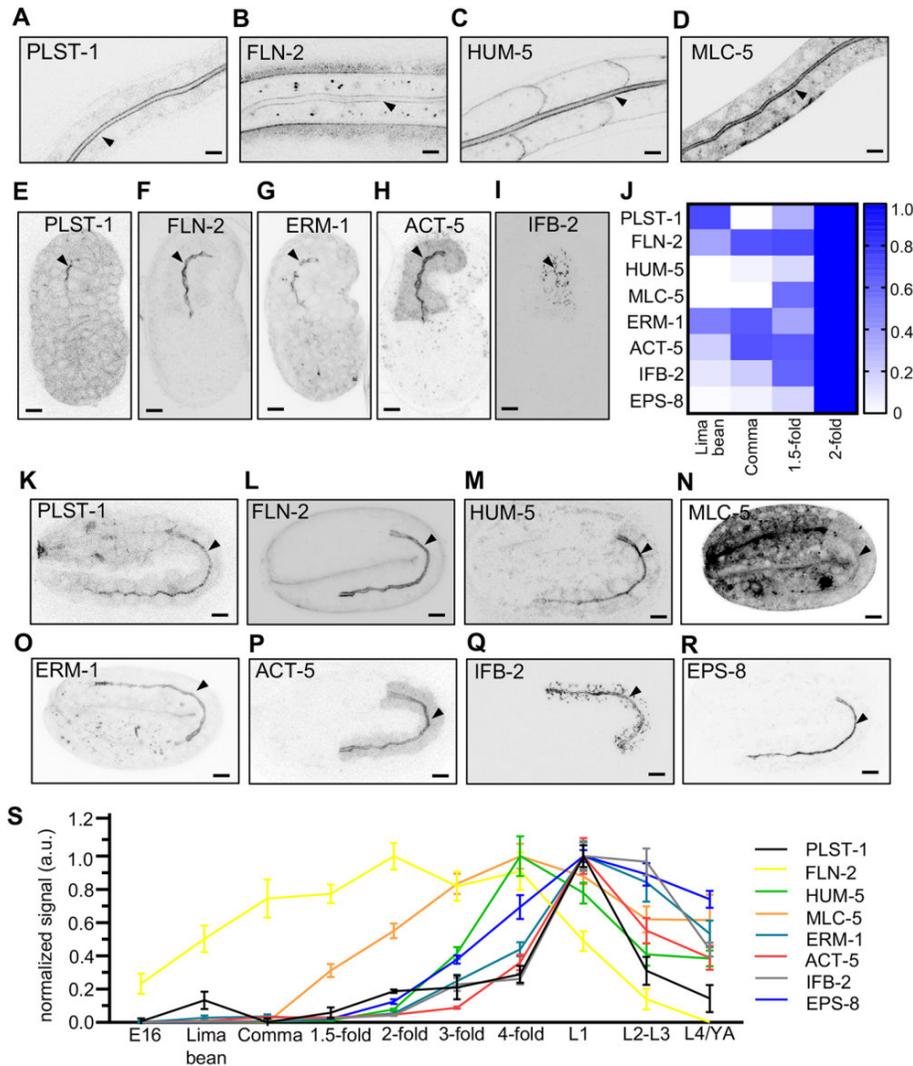
(B-E) Quantification of the lumen perimeter (B) and microvilli density (C), length (D) and width (E) from TEM images. Histograms show the mean $\pm$ s.e.m. of an average of 3-13 slices (B), 3-13 lumen (C) and 6-29 microvilli (D-E) per sample from three to five worms at each developmental stage. YA, young adults. ns, non-significant. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Statistical significance was calculated using unpaired Student's *t*-test except in C (4-fold versus L1 and L1 versus L2-L3), where a Mann-Whitney test was used due to a non-normal data distribution. (F) Transversal view of the brush border in an L4 worm illustrating microvilli hexagonal packing. Inset shows magnification of the boxed area with the putative hexagonal organization of microvilli highlighted by the red line. (G) The distance between microvilli edges and centers was calculated on 200 microvilli from two L4 larvae.

Individual microvilli were similarly visualized using random illumination microscopy (Mangeat et al., 2021), but not using conventional confocal or stimulated-emission-depletion microscopes (Fig. S4B). The brush border could also be imaged transversally (compare Figs 3D and 1F). Hence, the combination of a super-resolution imaging system, appropriate fluorophores and endogenous expression allows the visualization of individual microvilli in *C. elegans* intestine.

We then used these tools to characterize the (co)localization of known and newly identified apical markers in adult worms. Using a strain co-expressing endogenously tagged versions of two classical

brush border markers, ERM-1 and EPS-8, and the endotube's intermediate filament IFB-2, we observed that ERM-1 localized along the whole microvilli but not in the terminal web (Fig. 3E). EPS-8 accumulated at the tip of the microvilli, where it partially colocalized with ERM-1, and was also found marginally at the terminal web vicinity, as observed previously by immuno-electron microscopy (Croce et al., 2004) (Fig. 3E). Finally, we were able to resolve in some worms the difference between exogenously expressed ACT-5, which localized along and at the base of the microvilli, and the endotube marker IFB-2 (Geisler et al., 2019; Bossinger et al., 2004) (Fig. S4C).



**Fig. 2. Brush border components are dynamically enriched at the apical membrane during microvilli assembly.** (A-I) Representative images of the apical localization of GFP-tagged MLC-5, PLST-1 and ACT-5, mNG-tagged ERM-1, IFB-2 and HUM-5, and mVenus-tagged FLN-2 in L1/L2 larvae (A-D) and lima bean embryos (E-I). (J) The absolute apical signal of the indicated markers was measured on at least ten embryos at each developmental stage. The heatmap shows a focus on early brush border assembly steps where the maximum intensity was set at the 2-fold-stage. (K-R) Apical localization of the indicated markers at the 2-fold stage. (S) The absolute apical localization of the indicated markers was recorded as in J and normalized to the maximum expression for each marker. Data are mean  $\pm$  s.e.m. a.u., arbitrary units. In all images, arrowheads show the apical plasma membrane of the intestinal cells. Scale bars: 5  $\mu$ m.

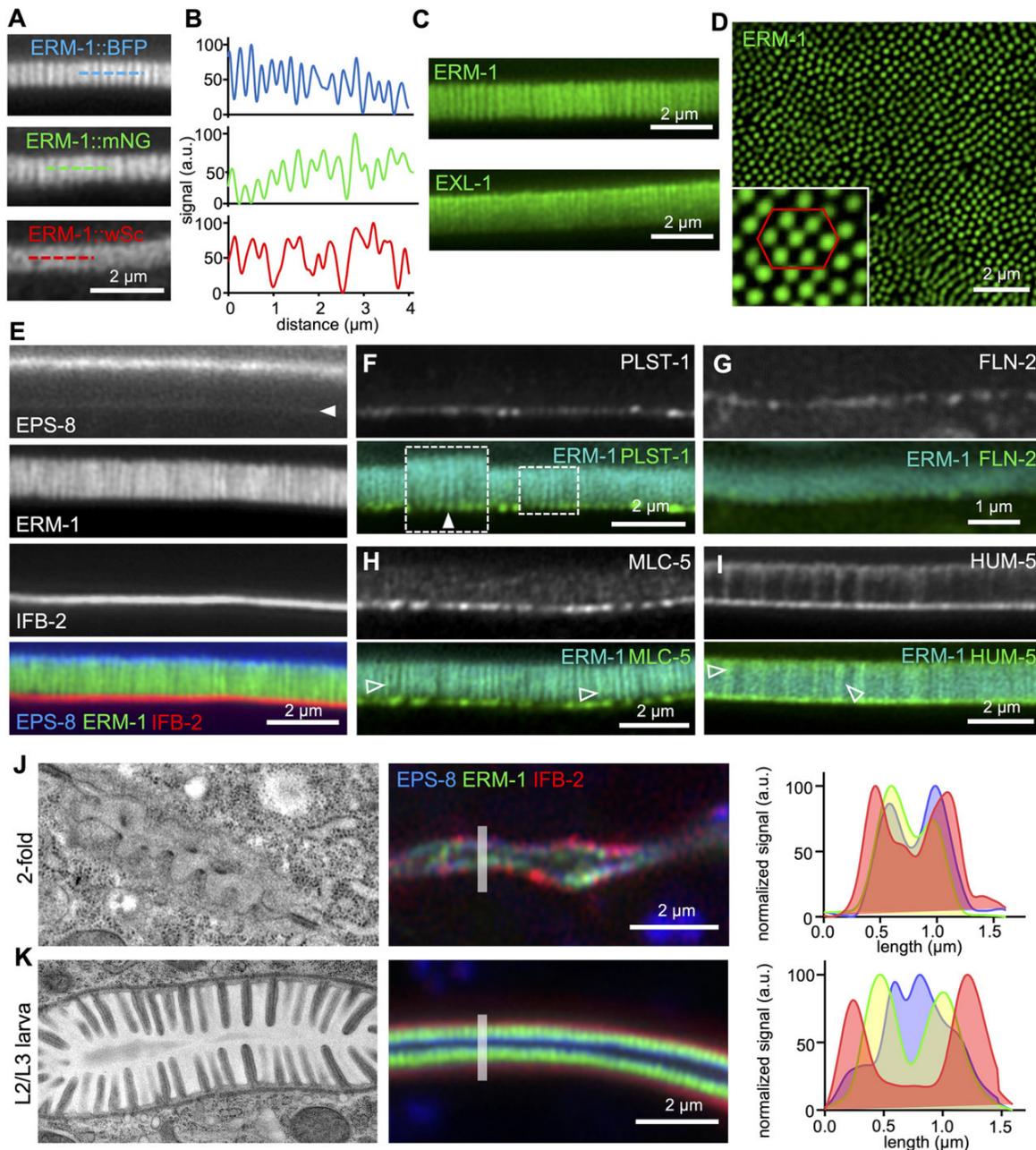
Notably, we found that PLST-1 localized at the bottom of the microvilli (Fig. 3F), with a dotted pattern that was different from the linear endotube pattern (IFB-2 in Fig. 3E). This localization is consistent with that of plastin 1 in mouse and its proposed role in anchoring actin rootlets (Grimm-Gunter et al., 2009). Whereas FLN-2 was hardly detectable in adult worms, we observed in L1 larvae that FLN-2 localized at the base of microvilli, similar to MLC-5, which also partly decorated the whole microvilli (Fig. 3G,H). Finally, we found that HUM-5 localized at both the base and the tip of microvilli, as well as marginally along their length (Fig. 3I), as observed in mouse intestine for Myo1d (Benesh et al., 2010).

Because factors needed to build the microvilli are concomitantly recruited to the apical pole (Fig. 2), we investigated whether super-resolution imaging could resolve the change in their relative microvillar position during brush border assembly. Line scans showed that ERM-1, EPS-8 and IFB-2 colocalized at the beginning of microvilli assembly (2-fold stage) and progressively moved away to end up with IFB-2 and EPS-8 contralaterally positioned and surrounding ERM-1 (Fig. 3J,K, Fig. S4D).

#### Analysis of brush border markers dynamics during microvilli assembly

We next analyzed the dynamics of microvillar components during and after brush border establishment using FRAP. Whereas ERM-1

was very dynamic in 1.5-fold embryos, which likely reflects its involvement in microvilli pre-assembly, it became surprisingly stable in the established brush border (adult worm), with little recovery even after >15 min (Fig. 4A, Fig. S5A), confirming recent observations (Ramalho et al., 2020; Rimmelzwaal et al., 2021). Analysis of ERM-1 fluorescence recovery throughout *C. elegans* development confirmed that ERM-1 dynamics progressively decreased concomitantly with brush border assembly and became almost static in larvae and adults (Fig. 4B,F,G). To confirm this, the dynamics of other structural components of the brush border was analyzed during microvilli pre-assembly (comma/1.5-fold), maturation (L1 larvae) and in adult worms; note that owing to embryo movements from the 2-fold stage, late embryonic developmental stages could not be investigated. Like ERM-1, EPS-8 was also very dynamic during microvilli pre-assembly but became highly stable in maturing and mature microvilli (Fig. 4C,F,G). ACT-5 also displayed dynamic behavior, albeit to a lesser extent, that persisted until L1 larvae (Fig. 4D,F,G), in agreement with F-actin mobile fractions in Caco-2 cells (~60%) (Waharte et al., 2005), to finally become stable at adulthood. Conversely, the behavior of intermediate filament IFB-2 was more stable at every developmental stage (Fig. 4E-G), which reflects its anchoring role for growing microvilli (Grimm-Gunter et al., 2009; Geisler et al., 2019). These results indicate that mature microvilli are stable *in vivo*. The

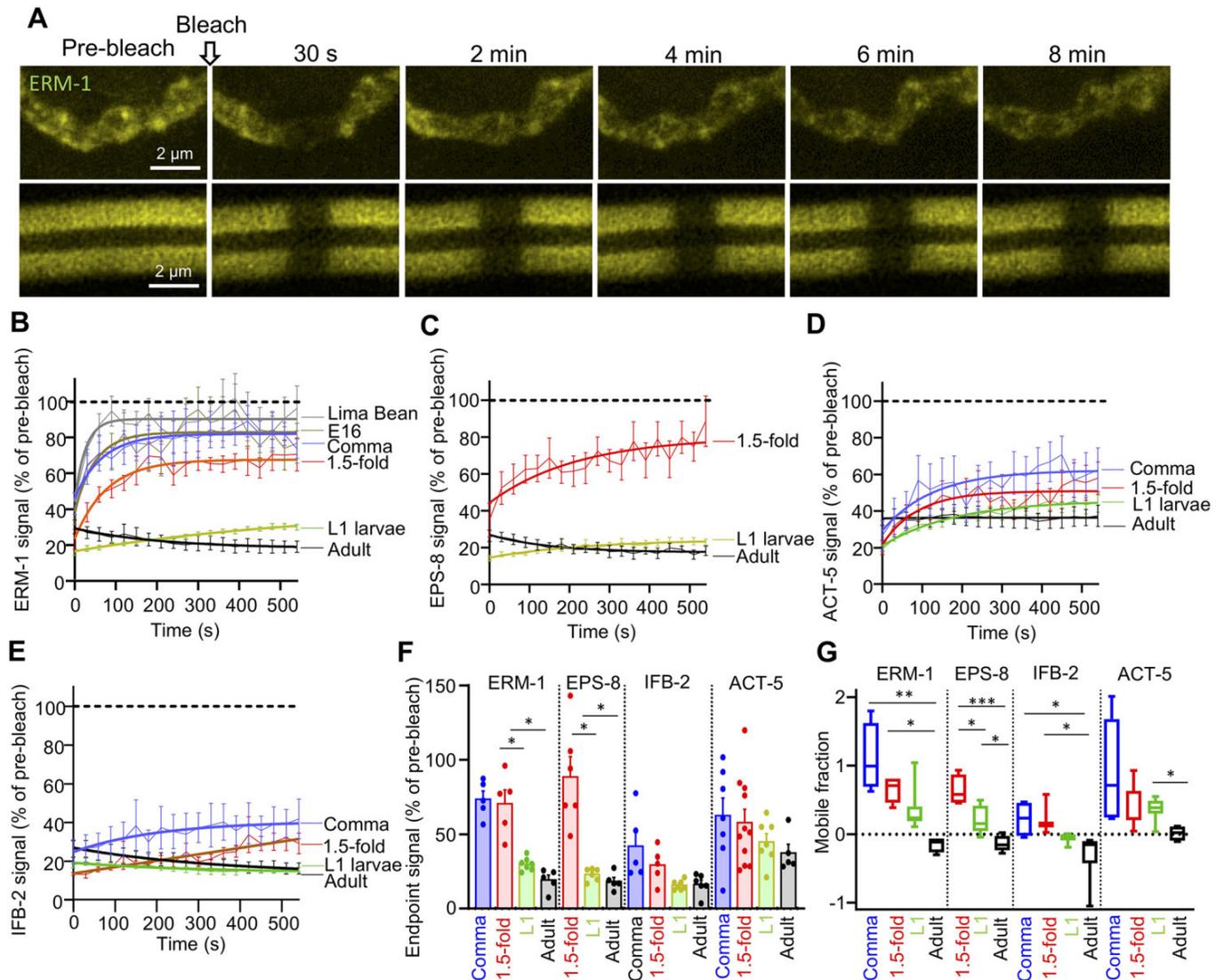


**Fig. 3. Super-resolution imaging of the brush border.** (A,B) Super-resolution images of ERM-1 endogenously tagged with BFP, mNG or wSc in *C. elegans* young adults. The graphs in B show the normalized intensity profile along a 4  $\mu\text{m}$ -long dashed line, as represented in A. (C) Super-resolution images of ERM-1::mNG or EXL-1::mNG in young adults. (D) Transversal super-resolution image of the brush border performed on a young adult *C. elegans* strain endogenously expressing ERM-1::mNG. Inset shows a magnified region with a red hexagon indicating the putative hexagonal packing of microvilli. (E-I) Representative super-resolution images of the indicated microvilli markers endogenously tagged with mNG (ERM-1, HUM-5), GFP (PLST-1, MLC-5), BFP (EPS-8), mVenus (FLN-2) or wSc (IFB-2) in young adults. In F, inset shows higher magnification of the boxed ROI. Filled and unfilled arrowheads show the colocalization between ERM-1 and the indicated markers at the base and along the microvilli, respectively. (J,K) Left: TEM images show the shape of the brush border at the corresponding developmental stage. Middle: Super-resolution images of the brush border in 2-fold embryo and L2-L3 larvae co-expressing EPS-8::BFP, ERM-1::mNG and IFB-2::wSc. Right: Histograms corresponding to the signal intensity profile of the three markers along the gray line depicted on the fluorescence images. a.u., arbitrary units.

maturation status of the brush border might be a key consideration in reconciling conflicting data of the literature. Indeed, immature microvilli in non-polarized cells seem to be more dynamic, i.e. life-cycle of  $\sim 12$  min in A6 cells (Gorelik et al., 2003), with intense actin treadmilling (half-time recovery of ezrin of  $\sim 30$  s) (Garbett and Bretscher, 2012); in contrast, microvilli have been found to last up to 12 h in mature brush borders (Meenderink et al., 2019). This high stability could partially explain their uniform length and

highly ordered organization in the human intestine (Crawley et al., 2014a).

In conclusion, this study shows for the first time the dynamic recruitment of microvilli components during brush border development and their localization at the individual microvillus level *in vivo*. This new toolbox will be instrumental in addressing the many remaining questions regarding microvilli assembly and maturation, notably determining the full set of factors required for



**Fig. 4. Brush border components dynamics during microvilli assembly.** (A) ERM-1::mNG was bleached in a 1.5-fold embryo and an adult worm, and fluorescence recovery was observed every 30 s. (B-E) Quantification of the signal recovery after bleaching of ERM-1::mNG (B), EPS-8::mNG (C), ACT-5::GFP (D) and IFB-2::mNG (E), measured every 30 s on 5-11 worms at the indicated developmental stages. Thin lines represent the mean $\pm$ s.e.m. of signal recovery, bold lines represent one-phase association non-linear regression fitting curves. (F, G) Analysis of the FRAP experiments shown in B-E at the comma, 1.5-fold, L1 larva and adult stages. F shows the percentage of the pre-bleached signal (mean of two time points) recovered at the endpoint (540 s) and G shows the mobile fraction. Histograms show the mean $\pm$ s.e.m., dots in F represent individual worms. The difference between variance was calculated using ANOVA, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001, \*\*\*\* $P$ <0.0001.

microvilli growth and maintenance, and the principles that govern microvilli size, packing and organization *in vivo*. It will also be essential to understand the pathophysiology of aging and of genetic, inflammatory or pathogenic diseases affecting the brush border.

## MATERIALS AND METHODS

### *C. elegans* strains and maintenance

Strains were maintained under typical conditions as described (Brenner, 1974). CRISPR-CAS9-genome edited mTagBFP2, mNeonGreen and mScarlet-tagged proteins were generated at the Biologie de *Caenorhabditis elegans* facility (Universite Lyon 1, UMS3421, Lyon, France). The strains used in this study are listed in Table S1. The sequence of alleles are available from the Dryad Digital Repository (Gregoire, 2021): dryad.qrfj6q5hh.

### *In vivo* confocal imaging in *C. elegans*

For *in vivo* imaging, *C. elegans* larvae were mounted on a 10% agarose pad in a solution of 100 nm polystyrene microbeads (Polysciences) to stop worm

movement. Embryos were mounted on a 2% agarose pad with a mix of bacteria and M9 medium (localization) or M9 only (live imaging). Single confocal slices of the anterior intestinal cells or stacks of the whole intestine were performed on adults/larvae and whole embryos, respectively, using a Leica SP8 (Wetzlar) equipped with a 63 $\times$ , 1.4 NA objective (LAS AF software) or a super-resolution Zeiss LSM880-Airyscan (Oberkochen) equipped with a 63 $\times$ , 1.4 NA objective (Zen Black software). For the image in Fig. 3D, young adult animals were washed to let the intestine out and have a large imaging surface. Quantitative recording of the apical localization of brush border markers was performed on the Leica SP8 microscope using the photon-counting function of HyD hybrid detectors and image accumulation (Fig. S3). For embryos, stacks were reconstructed using the max intensity z-projection function of Fiji software (<https://imagej.net/Fiji>). All images were examined using Fiji software.

### TEM

Samples were subjected to high-pressure freezing followed by freeze substitution, flat embedding, targeting and sectioning using the positional

correlation and tight trimming approach, as described previously (Bidaud-Meynard et al., 2019). Each embryo or larva was sectioned in five to ten different places, every 5–7  $\mu\text{m}$ , to ensure that different intestinal cells were observed. Ultrathin sections (60–70 nm) were collected on Formvar-coated slot grids (FCF2010-CU, EMS) and observed using a JEM-1400 transmission electron microscope (JEOL) operated at 120 kV, equipped with a Gatan Orius SC 1000 camera (Gatan) and piloted by the Digital Micrograph program.

### FRAP

FRAP experiments were performed using the Zeiss LSM880-Airyscan on a rectangular region of interest (ROI) of 1.3  $\mu\text{m}$  width crossing the apical plasma membrane with 100% 488 nm laser power, 10–20 iterations, and recovery was measured every 30 s for 10–15 min. Post-FRAP images were analyzed using the Fiji software. The mean fluorescence intensity of the bleached ROI was normalized for photobleaching by recording the intensity of the same ROI on a non-bleached region and cytoplasmic background was subtracted on each frame. Finally, the percentage recovery was calculated on each timeframe by comparing the normalized signal intensities with the mean of two time points before bleach. Curve fitting was performed with one-phase association non-linear regression analysis using GraphPad Prism 9 software. The mobile fraction ( $Mf$ ) was calculated with the following equation: 
$$Mf = \frac{I_{\infty} - I_0}{I_i - I_0}$$

where  $I_{\infty}$  is the signal intensity at the endpoint plateau phase,  $I_i$  is the mean of two pre-bleached signal intensities and  $I_0$  is the signal intensity at the first post-bleach time point.

### Quantification

TEM micrographs were analyzed using Fiji software and were representative of all the sections observed. Three to five independent worms at each developmental stage were examined in five to ten different sections along the antero-posterior axis. Lumen perimeter was measured around the apical membrane. In total, 32 (2-fold), 36 (3-fold), 31 (4-fold), 26 (L1), 22 (L2/3) and 20 (L4/young adults) lumen perimeters were measured. Microvilli length was measured from the tip to the point where their base intersected with the apical pole. Microvilli width was measured at mid-height. In total, 61 (2-fold), 83 (3-fold), 89 (4-fold), 60 (L1), 62 (L2/3) and 92 (L4/young adults) length and width measurements were performed. Microvilli density was defined as the number of microvilli per unit length of lumen perimeter. In total, 29 (2-fold), 32 (3-fold), 40 (4-fold), 30 (L1), 30 (L2/3) and 40 (L4/young adults) microvilli densities were determined.

For the quantitative measurement of the apical localization of brush border markers, a maximum intensity projection was performed using Fiji, and the signal density was quantified by measuring the mean fluorescence signal along a segmented line covering the whole intestine (E16 to 2-fold embryos) or visible part of the anterior intestine (3-fold to adults). The signal measured was then corrected for fluorescence accumulation and normalized.

### Statistical analysis

Results are presented as mean  $\pm$  s.e.m. of the number of independent experiments indicated in the legends, and scattered dots represent individual worms.  $P$ -values were calculated by two-tailed, unpaired Student's  $t$ -test or one-way ANOVA, as indicated in the figure captions, and a 95% confidence level was considered significant. Normal distribution of data and homogeneity of variances were validated using the Shapiro–Wilk and the Bartlett (for ANOVA) or  $F$  (for Student's) tests, respectively. Mann–Whitney or Kruskal–Wallis tests were used for calculating the  $P$ -values between two or multiple non-normal distributions, respectively, and Dunnett's tests was used for multiple distributions with non-homogenous variances.

### Acknowledgements

We thank Marc Tramier and Stéphanie Dutertre for their advice on fluorescence quantification and super-resolution imaging, respectively, as well as Matis Soleilhac for the initial analysis of expression patterns. We also thank Verena Göbel, Michel Labouesse, Junho Lee and Ronen Zaidel-Bar for strains, Maité Carre-Pierrat (Biology of *Caenorhabditis elegans* Facility, Université Lyon 1, UMS3421) for

generating CRISPR strains, as well as Céline Burcklé and Guillaume Halet for helpful discussions. Some strains were provided by the CGC, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440; University of Minnesota, USA). Imaging was performed at the Microscopy Rennes imaging Center (MRIC, Biosit, Rennes, France), a member of the national infrastructure France-Biomechanics supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04).

### Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

### Author contributions

Conceptualization: A.B.-M., G.M.; Methodology: A.B.-M., F.D., O.N., A.P., G.M.; Validation: A.B.-M., F.D., O.N., A.P., G.M.; Formal analysis: A.B.-M., F.D., O.N., A.P., G.M.; Investigation: A.B.-M., F.D., O.N., A.P., G.M.; Resources: S.K.S., C.N.P., F.B.R.; Data curation: A.B.-M., F.D., O.N., A.P., G.M.; Writing - original draft: A.B.-M., G.M.; Writing - review & editing: A.B.-M., O.N., A.P., G.M.; Visualization: A.B.-M., G.M.; Supervision: G.M.; Project administration: G.M.; Funding acquisition: A.B.-M., G.M.

### Funding

This work was supported by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under a Marie Skłodowska-Curie Actions grant agreement (844070 to A.B.-M.), Défis scientifiques de l'Université de Rennes 1 (17CQ436-S0 to A.B.-M. and G.M.), Ligue Contre le Cancer 22, 29, 35, 41, 72, 85 and the Fondation Maladies Rares (169608 and EXM-2019-1013 to G.M.). The G.M. laboratory also received institutional funding from the Centre National De La Recherche Scientifique and the Université de Rennes 1.

### Data availability

The sequences of alleles available from the Dryad Digital Repository (Gregoire, 2021): dryad.qrfj6q5hh.

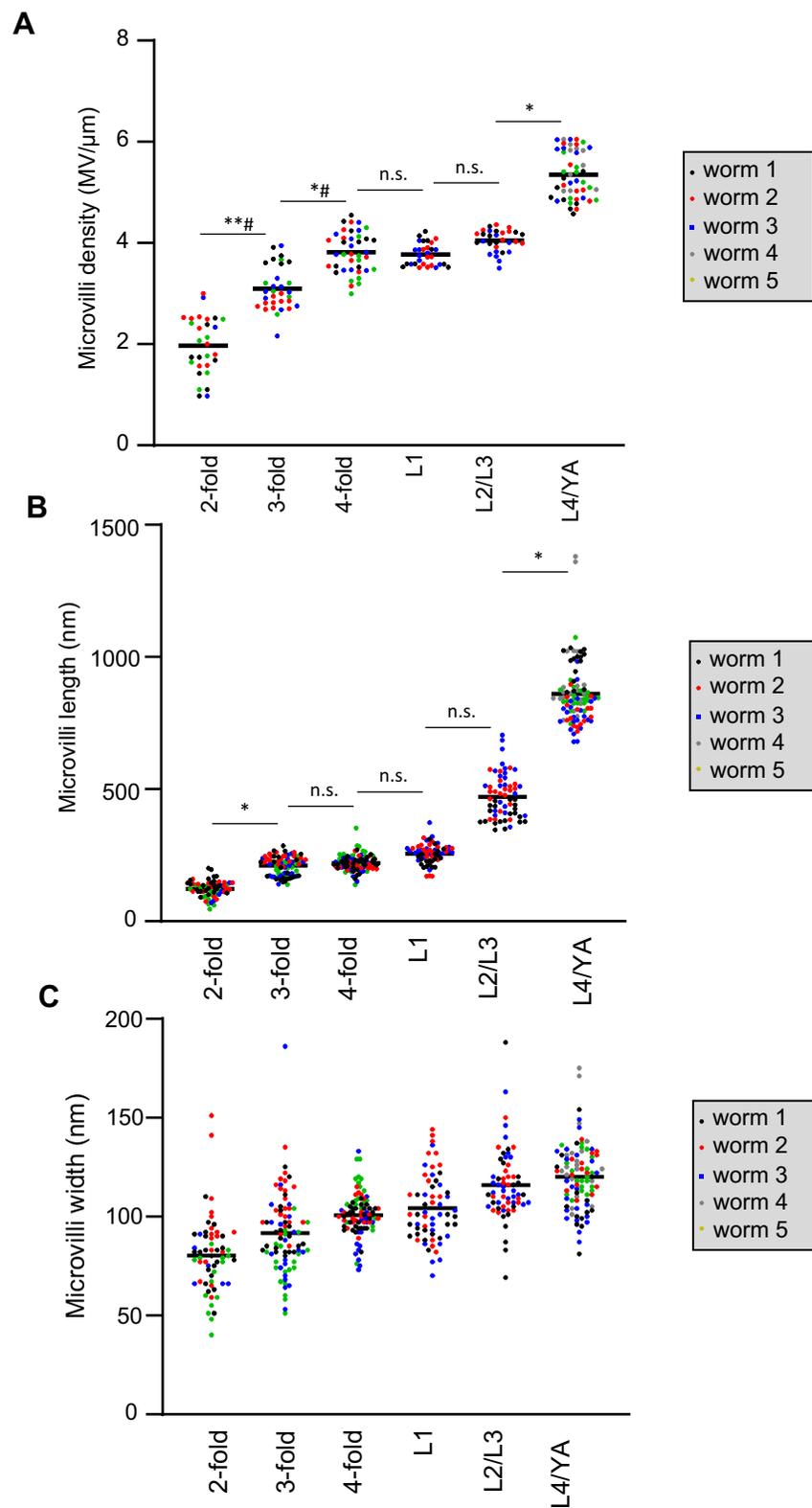
### Peer review history

The peer review history is available online at <https://journals.biologists.com/dev/article-lookup/doi/10.1242/dev.200029>.

### References

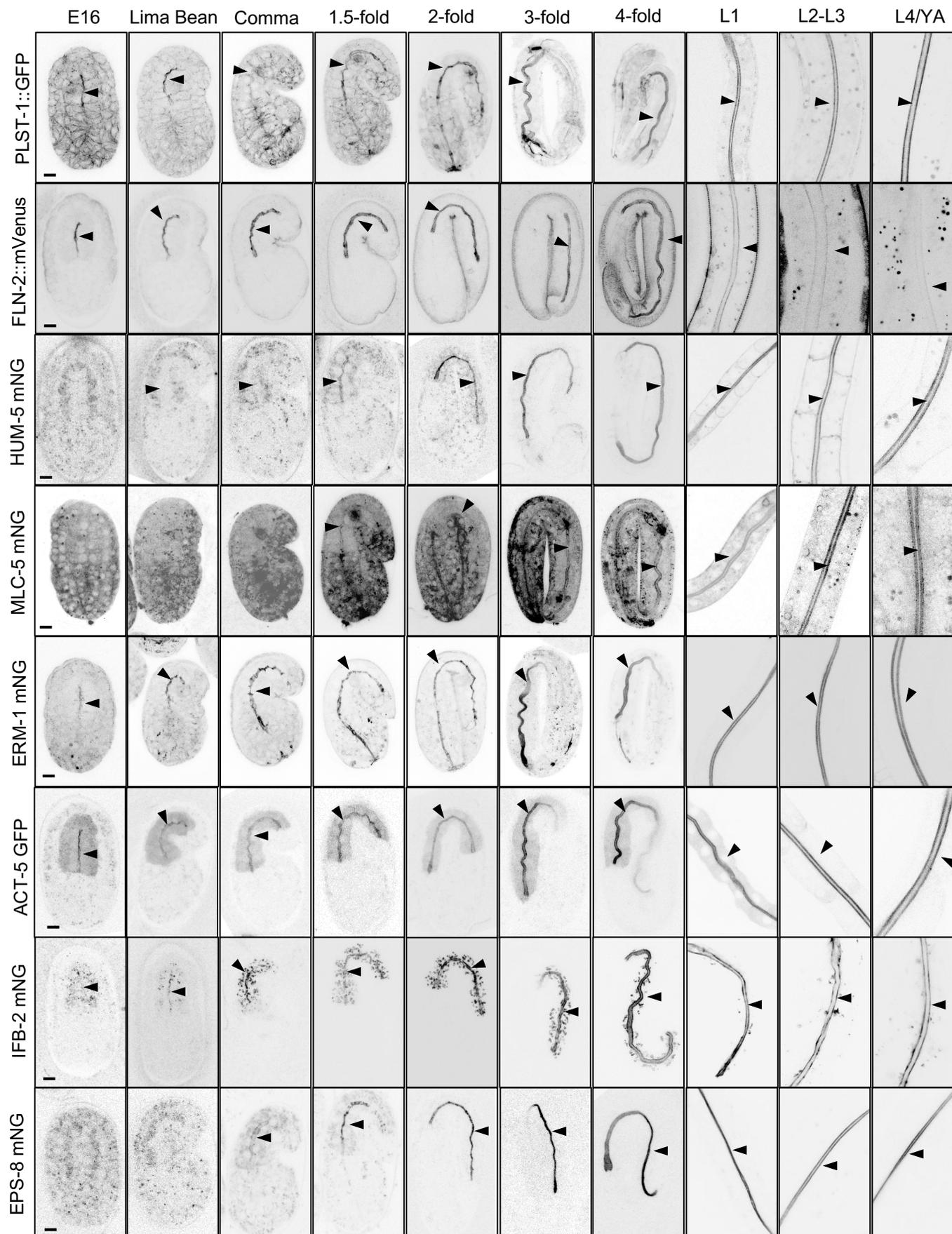
- Achilleos, A., Wehman, A. M. and Nance, J. (2010). PAR-3 mediates the initial clustering and apical localization of junction and polarity proteins during *C. elegans* intestinal epithelial cell polarization. *Development* **137**, 1833–1842. doi:10.1242/dev.047647
- Altun, Z. F. and Hall, D. H. (2009). Handbook of *C. elegans* Anatomy. In *WormAtlas*. <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>
- Asan, A., Raiders, S. A. and Priess, J. R. (2016). Morphogenesis of the *C. elegans* intestine involves axon guidance genes. *PLoS Genet.* **12**, e1005950. doi:10.1371/journal.pgen.1005950
- Benesh, A. E., Nambiar, R., Mcconnell, R. E., Mao, S., Tabb, D. L. and Tyska, M. J. (2010). Differential localization and dynamics of class I myosins in the enterocyte microvillus. *Mol. Biol. Cell* **21**, 970–978. doi:10.1091/mbc.e09-07-0638
- Bidaud-Meynard, A., Nicolle, O., Heck, M., Le Cunff, Y. and Michaux, G. (2019). A V0-ATPase-dependent apical trafficking pathway maintains the polarity of the intestinal absorptive membrane. *Development* **146**, dev174508. doi:10.1242/dev.174508
- Bossinger, O., Fukushige, T., Claeys, M., Borgonie, G. and Mcghee, J. D. (2004). The apical disposition of the *Caenorhabditis elegans* intestinal terminal web is maintained by LET-413. *Dev. Biol.* **268**, 448–456. doi:10.1016/j.ydbio.2004.01.003
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71–94. doi:10.1093/genetics/77.1.71
- Chang, J., Chance, M. R., Nicholas, C., Ahmed, N., Guilmeau, S., Flandez, M., Wang, D., Byun, D. S., Nasser, S., Albanese, J. M. et al. (2008). Proteomic changes during intestinal cell maturation in vivo. *J. Proteomics* **71**, 530–546. doi:10.1016/j.jprot.2008.08.003
- Chinowsky, C. R., Pinette, J. A., Meenderink, L. M., Lau, K. S. and Tyska, M. J. (2020). Nonmuscle myosin-2 contractility-dependent actin turnover limits the length of epithelial microvilli. *Mol. Biol. Cell* **31**, 2803–2815. doi:10.1091/mbc.E20-09-0582
- Cordova-Burgos, L., Patel, F. B. and Soto, M. C. (2021). E-Cadherin/HMR-1 membrane enrichment is polarized by WAVE-dependent branched actin. *J. Dev. Biol.* **9**, 19. doi:10.3390/jdb9020019
- Crawley, S. W., Mooseker, M. S. and Tyska, M. J. (2014a). Shaping the intestinal brush border. *J. Cell Biol.* **207**, 441–451. doi:10.1083/jcb.201407015
- Crawley, S. W., Shifrin, D. A., Jr, Grega-Larson, N. E., Mcconnell, R. E., Benesh, A. E., Mao, S., Zheng, Y., Zheng, Q. Y., Nam, K. T., Millis, B. A. et al.

- (2014b). Intestinal brush border assembly driven by protocadherin-based intermicrovillar adhesion. *Cell* **157**, 433-446. doi:10.1016/j.cell.2014.01.067
- Croce, A., Cassata, G., Disanza, A., Gagliani, M. C., Tacchetti, C., Malabarba, M. G., Carlier, M. F., Scita, G., Baumeister, R. and Di Fiore, P. P.** (2004). A novel actin barbed-end-capping activity in EPS-8 regulates apical morphogenesis in intestinal cells of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1173-1179. doi:10.1038/ncb1198
- El Mouridi, S., Lecroisey, C., Tardy, P., Mercier, M., Leclercq-Blondel, A., Zariohi, N. and Boulin, T.** (2017). Reliable CRISPR/Cas9 genome engineering in *Caenorhabditis elegans* using a single efficient sgRNA and an easily recognizable phenotype. *G3 (Bethesda)* **7**, 1429-1437. doi:10.1534/g3.117.040824
- Faust, J. J., Millis, B. A. and Tyska, M. J.** (2019). Profilin-mediated actin allocation regulates the growth of epithelial microvilli. *Curr. Biol.* **29**, 3457-3465.e3. doi:10.1016/j.cub.2019.08.051
- Feldman, J. L. and Priess, J. R.** (2012). A role for the centrosome and PAR-3 in the hand-off of MTOC function during epithelial polarization. *Curr. Biol.* **22**, 575-582. doi:10.1016/j.cub.2012.02.044
- Fili, N. and Toseland, C. P.** (2019). Unconventional myosins: how regulation meets function. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 67. doi:10.3390/ijms21010067
- Gaeta, I. M., Meenderink, L. M., Postema, M. M., Cencer, C. S. and Tyska, M. J.** (2021). Direct visualization of epithelial microvilli biogenesis. *Curr. Biol.* **31**, 2561-2575.e6. doi:10.1016/j.cub.2021.04.012
- Gally, C., Wissler, F., Zahreddine, H., Quintin, S., Landmann, F. and Labouesse, M.** (2009). Myosin II regulation during *C. elegans* embryonic elongation: LET-502/ROCK, MRCK-1 and PAK-1, three kinases with different roles. *Development* **136**, 3109-3119. doi:10.1242/dev.039412
- Garbett, D. and Bretscher, A.** (2012). PDZ interactions regulate rapid turnover of the scaffolding protein EBP50 in microvilli. *J. Cell Biol.* **198**, 195-203. doi:10.1083/jcb.201204008
- Geisler, F., Coch, R. A., Richardson, C., Goldberg, M., Denecke, B., Bossinger, O. and Leube, R. E.** (2019). The intestinal intermediate filament network responds to and protects against microbial insults and toxins. *Development* **146**, dev169482. doi:10.1242/dev.169482
- Geisler, F., Coch, R. A., Richardson, C., Goldberg, M., Bevilacqua, C., Prevedel, R. and Leube, R. E.** (2020). Intestinal intermediate filament polypeptides in *C. elegans*: Common and isotype-specific contributions to intestinal ultrastructure and function. *Sci. Rep.* **10**, 3142. doi:10.1038/s41598-020-59791-w
- Gobel, V., Barrett, P. L., Hall, D. H. and Fleming, J. T.** (2004). Lumen morphogenesis in *C. elegans* requires the membrane-cytoskeleton linker erm-1. *Dev Cell* **6**, 865-873. doi:10.1016/j.devcel.2004.05.018
- Gorelik, J., Shevchuk, A. I., Frolenkov, G. I., Diakonov, I. A., Lab, M. J., Kros, C. J., Richardson, G. P., Vodyanov, I., Edwards, C. R., Klenerman, D. et al.** (2003). Dynamic assembly of surface structures in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5819-5822. doi:10.1073/pnas.1030502100
- Gregoire, M.** (2021). High resolution dynamic mapping of the *C. elegans* intestinal brush border. *Dryad Dataset*. doi:10.5061/dryad.qrfj6q5hh
- Grimm-Gunter, E. M., Revenu, C., Ramos, S., Hurbain, I., Smyth, N., Ferrary, E., Louvard, D., Robine, S. and Rivero, F.** (2009). Plastin 1 binds to keratin and is required for terminal web assembly in the intestinal epithelium. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2549-2562. doi:10.1091/mbc.e08-10-1030
- Houdusse, A. and Titus, M. A.** (2021). The many roles of myosins in filopodia, microvilli and stereocilia. *Curr. Biol.* **31**, R586-R602. doi:10.1016/j.cub.2021.04.005
- Hunt-Newbury, R., Viveiros, R., Johnsen, R., Mah, A., Anastas, D., Fang, L., Halfnight, E., Lee, D., Lin, J., Lorich, A. et al.** (2007). High-throughput in vivo analysis of gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* **5**, e237. doi:10.1371/journal.pbio.0050237
- Leung, B., Hermann, G. J. and Priess, J. R.** (1999). Organogenesis of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev. Biol.* **216**, 114-134. doi:10.1006/dbio.1999.9471
- Liang, J., Shaulov, Y., Savage-Dunn, C., Boissinot, S. and Hoque, T.** (2017). Chloride intracellular channel proteins respond to heat stress in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* **12**, e0184308. doi:10.1371/journal.pone.0184308
- Loveless, T. and Hardin, J.** (2012). Cadherin complexity: recent insights into cadherin superfamily function in *C. elegans*. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 695-701. doi:10.1016/j.cob.2012.06.008
- MacQueen, A. J., Baggett, J. J., Perumov, N., Bauer, R. A., Januszewski, T., Schriefer, L. and Waddle, J. A.** (2005). ACT-5 is an essential *Caenorhabditis elegans* actin required for intestinal microvilli formation. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3247-3259. doi:10.1091/mbc.e04-12-1061
- Mangeat, T., Labouesse, S., Allain, M., Negash, A., Martin, E., Guérolé, A., Poincloux, R., Estibal, C., Bouissou, A., Cantaloube, S. et al.** (2021). Super-resolved live-cell imaging using random illumination microscopy. *Cell Reports Methods* **1**, 100009. doi:10.1016/j.crmeth.2021.100009
- Mariadason, J. M., Nicholas, C., L'italien, K. E., Zhuang, M., Smartt, H. J., Heerdt, B. G., Yang, W., Corner, G. A., Wilson, A. J., Klampfer, L. et al.** (2005). Gene expression profiling of intestinal epithelial cell maturation along the crypt-villus axis. *Gastroenterology* **128**, 1081-1088. doi:10.1053/j.gastro.2005.01.054
- Mcconnell, R. E., Benesh, A. E., Mao, S., Tabb, D. L. and Tyska, M. J.** (2011). Proteomic analysis of the enterocyte brush border. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **300**, G914-G926. doi:10.1152/ajpgi.00005.2011
- Meenderink, L. M., Gaeta, I. M., Postema, M. M., Cencer, C. S., Chinowsky, C. R., Krystofiak, E. S., Millis, B. A. and Tyska, M. J.** (2019). Actin dynamics drive microvillar motility and clustering during brush border assembly. *Dev. Cell* **50**, 545-556.e4. doi:10.1016/j.devcel.2019.07.008
- Nicolle, O., Burel, A., Griffiths, G., Michaux, G. and Kolotuev, I.** (2015). Adaptation of cryo-sectioning for IEM labeling of asymmetric samples: a study using *Caenorhabditis elegans*. *Traffic* **16**, 893-905. doi:10.1111/tra.12289
- Postema, M. M., Grega-Larson, N. E., Neining, A. C. and Tyska, M. J.** (2018). IRTKS (BAIAP2L1) elongates epithelial microvilli using EPS8-dependent and independent mechanisms. *Curr. Biol.* **28**, 2876-2888.e4. doi:10.1016/j.cub.2018.07.022
- Ramalho, J. J., Sepers, J. J., Nicolle, O., Schmidt, R., Cravo, J., Michaux, G. and Boxem, M.** (2020). C-terminal phosphorylation modulates ERM-1 localization and dynamics to control cortical actin organization and support lumen formation during *Caenorhabditis elegans* development. *Development* **147**, dev188011. doi:10.1242/dev.188011
- Remmelzwaal, S., Geisler, F., Stucchi, R., Van Der Horst, S., Pasolli, M., Kroll, J. R., Jarosinska, O. D., Akhmanova, A., Richardson, C. A., Altelaar, M. et al.** (2021). BBLN-1 is essential for intermediate filament organization and apical membrane morphology. *Curr. Biol.* **31**, 2334-2346.e9. doi:10.1016/j.cub.2021.03.069
- Sato, K., Norris, A., Sato, M. and Grant, B. D.** (2014). *C. elegans* as a model for membrane traffic. *WormBook* **25**, 1-47. doi:10.1895/wormbook.1.77.2
- Sauvanet, C., Wayt, J., Pelaseyed, T. and Bretscher, A.** (2015). Structure, regulation, and functional diversity of microvilli on the apical domain of epithelial cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **31**, 593-621. doi:10.1146/annurev-cellbio-100814-125234
- Shaner, N. C., Lambert, G. G., Chammas, A., Ni, Y., Cranfill, P. J., Baird, M. A., Sell, B. R., Allen, J. R., Day, R. N., Israelsson, M. et al.** (2013). A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat. Methods* **10**, 407-409. doi:10.1038/nmeth.2413
- Subach, O. M., Cranfill, P. J., Davidson, M. W. and Verkhusha, V. V.** (2011). An enhanced monomeric blue fluorescent protein with the high chemical stability of the chromophore. *PLoS One* **6**, e28674. doi:10.1371/journal.pone.0028674
- Van Furden, D., Johnson, K., Segbert, C. and Bossinger, O.** (2004). The *C. elegans* ezrin-radixin-moesin protein ERM-1 is necessary for apical junction remodelling and tubulogenesis in the intestine. *Dev. Biol.* **272**, 262-276. doi:10.1016/j.ydbio.2004.05.012
- Vogel, G. F., Klee, K. M., Janecke, A. R., Muller, T., Hess, M. W. and Huber, L. A.** (2015). Cargo-selective apical exocytosis in epithelial cells is conducted by Myo5B, Slp4a, Vamp7, and Syntaxin 3. *J. Cell Biol.* **211**, 587-604. doi:10.1083/jcb.201506112
- Waharte, F., Brown, C. M., Coscoy, S., Coudrier, E. and Amblard, F.** (2005). A two-photon FRAP analysis of the cytoskeleton dynamics in the microvilli of intestinal cells. *Biophys. J.* **88**, 1467-1478. doi:10.1529/biophysj.104.049619
- Zhang, R. and Hou, A.** (2013). Host-Microbe Interactions in *Caenorhabditis elegans*. *ISRN Microbiol.* **2013**, 356451. doi:10.1155/2013/356451
- Zhang, H., Kim, A., Abraham, N., Khan, L. A. and Gobel, V.** (2013). Vesicular sorting controls the polarity of expanding membranes in the *C. elegans* intestine. *Worm* **2**, e23702. doi:10.4161/worm.23702
- Zhou, X., Massol, R. H., Nakamura, F., Chen, X., Gewurz, B. E., Davis, B. M., Lencer, W. I. and Waldor, M. K.** (2014). Remodeling of the intestinal brush border underlies adhesion and virulence of an enteric pathogen. *mBio* **5**, e01639-14. doi:10.1128/mBio.01639-14

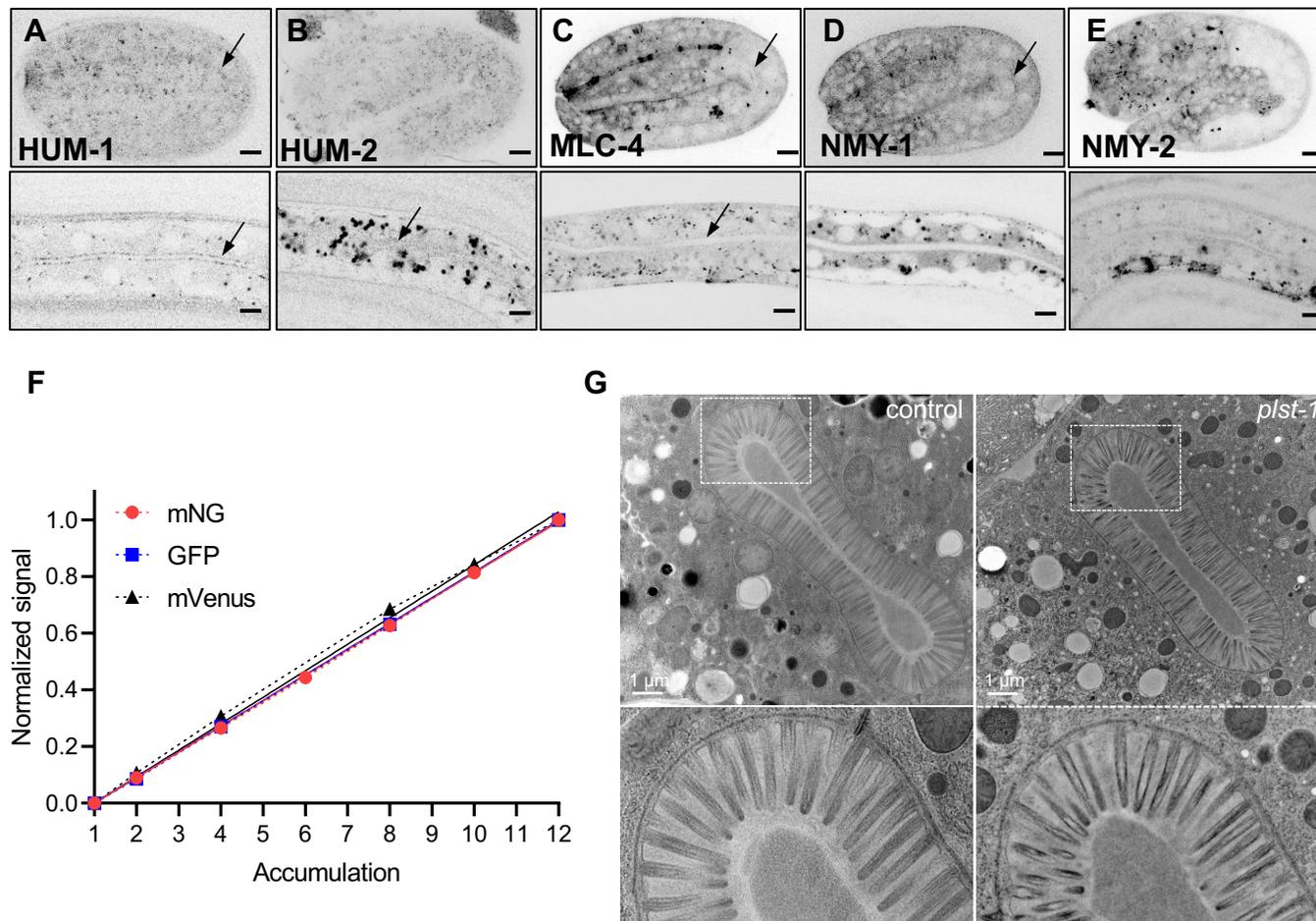


**Fig. S1. Individual values of brush border measurements by TEM, related to Fig. 1.**

Colorized dots represent individual worms at the indicated developmental stages. Bar is the grand mean of all the measurements. Microvilli density was measured on 3-13 slices/worm, microvilli length and width on 6-29 microvilli/worm. N.s., non-significant, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Except in A, where some data were analysed by unpaired t-test (#), statistical significance was calculated using Mann-Whitney test.

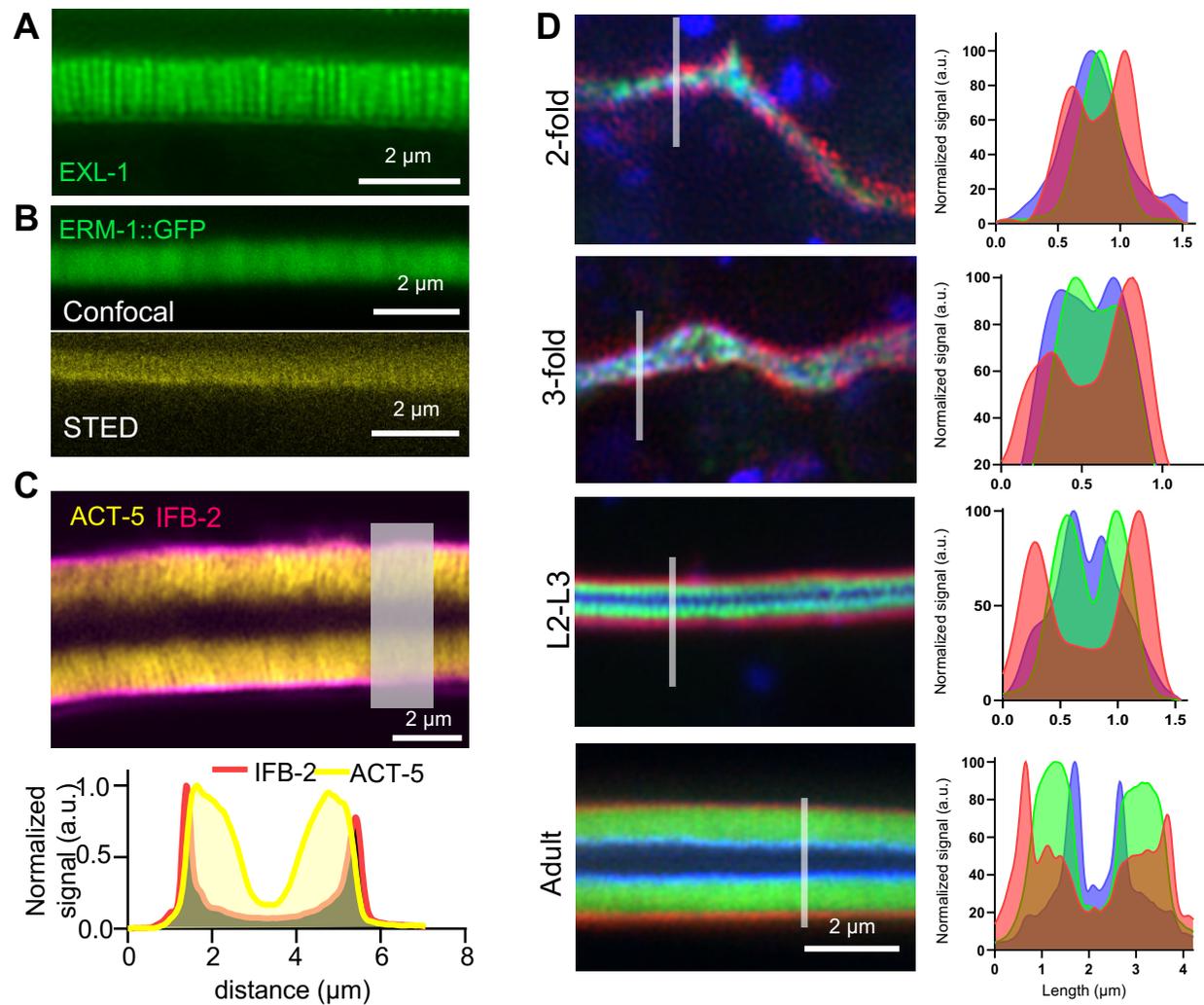


**Fig. S2. Systematic analysis of brush border markers during *C. elegans* development.** Representative confocal images of the endogenously tagged markers indicated (except ACT-5::GFP). Arrowheads show the intestinal cells apical PM. Scale bar is 5  $\mu$ m.

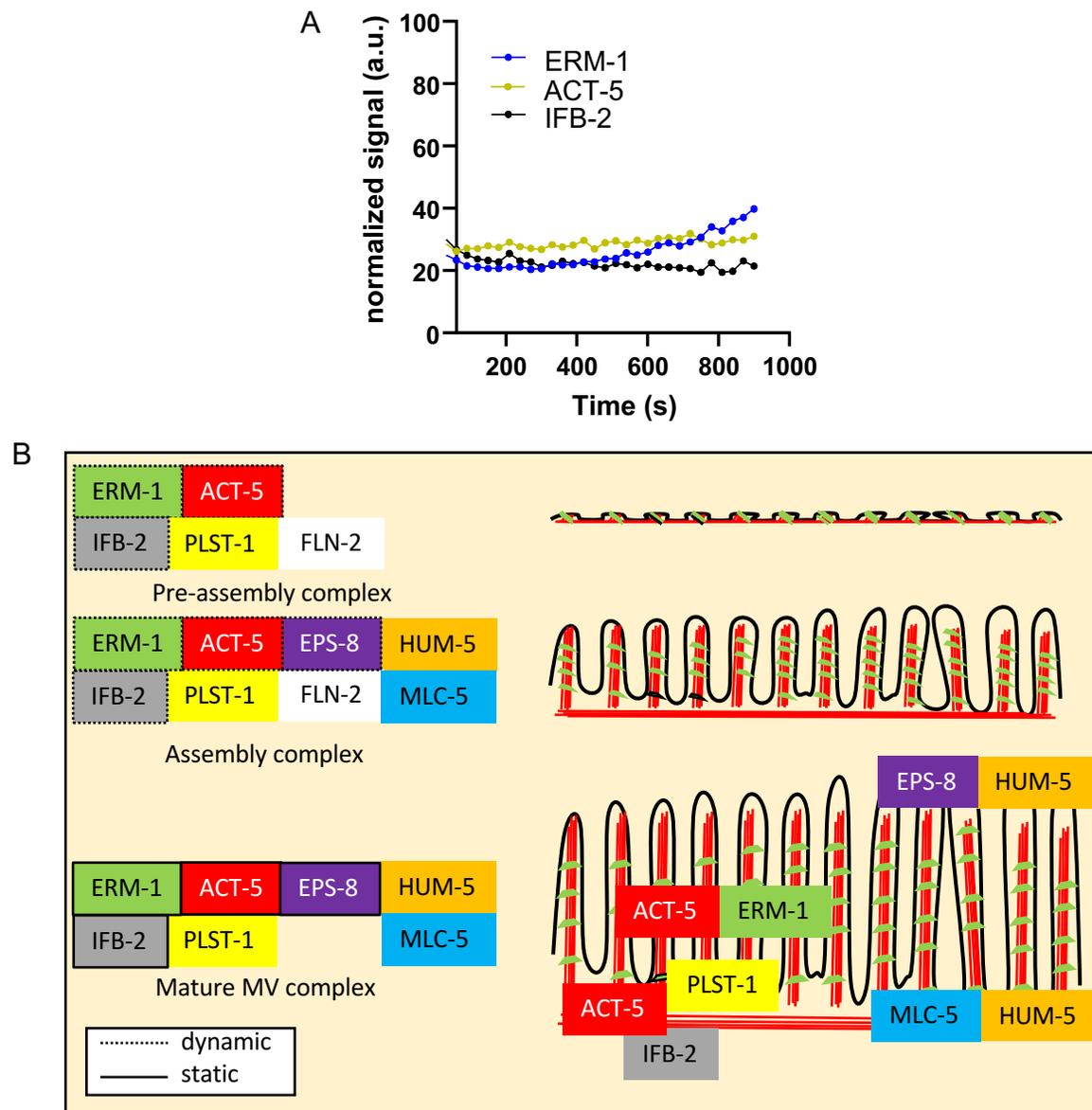


**Fig. S3. Systematic analysis of brush border markers during *C. elegans* development.**

(A-E) Representative confocal images of *C. elegans* strains expressing endogenously tagged versions of the indicated markers, which showed no apical accumulation during *C. elegans* intestine development. Scale bar, 5  $\mu$ m. (F) Control of the quantitative assessment of brush border markers arrival at the apical PM. Accumulation of IFB-2::mNG, PLST-1::GFP and FLN-2::mVenus signal linearly increases with image accumulation. Experimental points are linked by dashed lines, bold lines show simple linear regression curve fitting. n=1-2 measurement per timepoint for each fluorophore. (G) Representative TEM images of control (N2) and *plst-1(tm4255)* L4/young adult worms (N=3 worms in each condition).



**Fig. S4. Super-resolution imaging of brush border markers *in vivo*.** (A) Representative super-resolution image of exogenously expressed EXL-1::GFP. (B) ERM-1::GFP was imaged in adult worms using the indicated microscopes. (C) Super-resolution images of a *C. elegans* adults co-expressing ACT-5::GFP and IFB-2::wSc. Bottom panel shows a normalized intensity profile along the line depicted in grey. (D) Representative images of the localization of endogenously tagged EPS-8::BFP, ERM-1::mNG and IFB-2::wSc in *C. elegans* at the indicated developmental stages. Right panels show an intensity profile of the three markers along the line depicted in left panels. Scale bars, 2  $\mu\text{m}$ .



**Fig. S5. Dynamic recruitment of brush border components.**

(A) Longer measurement of brush border components dynamics in adult worms. The curves show the recovery of ERM-1::mNG, IFB-2::mNG and ACT-5::GFP signal every 30 s after photobleaching, measured for an extended time,  $n=1$  for each marker. (B) Model of brush border assembly *in vivo* in *C. elegans*. Microvilli are built from a preformed *pre-assembly complex* and grow through the dynamic recruitment of brush border components, which become highly stable in the mature brush border.

**Table S1. *C. elegans* strains used in this study.**

Strain	Markers/targets	Genotype	Reference
FBR96	MLC-4	mlc-4(jme04[mlc-4::eGFP+loxP]) III	Francois Robin lab
FBR140	MLC-5	mlc-5(jme09[GFP^3xFLAG::mlc-5]) III	Francois Robin lab
FBR222	FLN-2	fln-2(jme-19[fln-2::mVenus]) X	Francois Robin lab
FL274	ERM-1, IFB-2	erm-1(bab59[erm-1::mNG^SEC^3xFlag]) I ; ifb-2(bab142[ifb-2::wSc]) II	Bidaud-Meynard et al., 2019
FL290	EPS-8	eps-8(bab140[eps-8::mNG]) IV	This study
FL369	ERM-1, ACT-5	fgEx13[perm-1::erm-1::gfp + rol-6 (su1006)] ; jyls17 [vha-6p::mcherry::act-5, ttx-3p::RFP]	Bidaud-Meynard et al., 2019
FL378	ERM-1	erm-1(bab59[erm-1::mNG^3xFlag]) I	Bidaud-Meynard et al., 2019
FL379	ERM-1	bab64[erm-1::wrmSc^3xFlag] I	Bidaud-Meynard et al., 2019
FL381	ACT-5, IFB-2	fgEx12 (act-5p::act-5::gfp); ifb-2(bab142[ifb-2::wrmSc]) II	This study
FL383	EPS-8, ERM-1, IFB-2	eps-8(bab140[eps-8::mNG]) IV ; erm-1(bab59[erm-1::mNG^SEC^3xFlag]) I; ifb-2(bab142[ifb-2::wSc]) II	This study
FL384	ERM-1	erm-1(bab167[erm-1::degron-tagBFP2]) I	This study
FL385	IFB-2	ifb-2(bab153[ifb-2::mNG]) II	This study
FL386	ERM-1, PLST1	erm-1(bab167[erm-1::degron-tagBFP2]) ; plst-1(msn190[plst-1::gfp]) IV	This study
FL387	ERM1, HUM5	erm-1(bab167[erm-1::degron-tagBFP2]) ; hum-5(bab189[hum-5::mNG]) III	This study
FL388	ERM-1, MLC5	erm-1(bab167[erm-1::degron-tagBFP2]) ; mlc-5(jme09[GFP^3xFLAG::mlc-5]) III	This study
FL586	ERM-1, FLN-2	erm-1(bab167[erm-1::degron-tagBFP2]), fln-2(jme-19[fln-2::mVenus]) X	This study
LP162	NMY-2	nmy-2(cp13[nmy-2::GFP + LoxP]) I	CGC
LP462	MRCK-1	mrck-1(cp189[mrck-1::GFP::3xFlag]) V	CGC
MCP111	PGP-1	pgp-1(bab111[mNG^3xFlag::pgp-1]) IV	Bidaud-Meynard et al., 2019
MCP184	HUM-2	hum-2(bab184[hum-2::mNG]) V	This study
MCP189	HUM-5	hum-5(bab189[hum-5::mNG]) III	This study
MCP223	EXL-1	exl-1(bab223[exl-1::mNG]) II	This study
ML2540	NMY-1	nmy-1(mc82[nmy-1::gfp]) X.	Vuong-Brender et al., 2017
OH2211	EXL-1	otEx1184 [exl-1p::exl-1::GFP + rol-6(su1006)]	CGC
QQ226	HUM-1	hum-1(cv21[hum-1::RFP]) I	CGC
RZB213	PLST-1	plst-1(msn190[plst-1::gfp]) IV	Ding et al., 2017
RZB365	PLST-1	plst-1(tm4255)	Ronen Zaidel-Bar lab
VJ268	ACT-5	fgEx12(act-5p::act-5::gfp)	Zhang et al., 2012

**File S1.**

[Click here to download Supplementary File 1](#)

# Discussion

Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé le rôle de la protéine kinase PAR-4 au cours du développement de l'intestin chez *C. elegans*. Pour ce faire, j'ai utilisé une approche de perte de fonction via la souche thermosensible *par-4(it47)*. Mes résultats de thèse suggèrent que PAR-4 n'est pas nécessaire à l'établissement de la polarité apico-basale des entérocytes. Par ailleurs, la perte de fonction de PAR-4 n'empêche pas la formation de microvillosités qui présentent toutefois des défauts mineurs de taille. De plus, les jonctions apicales sont également plus longues dans les embryons *par-4(it47)*. Ainsi, PAR-4 n'est pas strictement nécessaire à la polarité épithéliale des cellules intestinales. En revanche, la protéine PAR-4 contrôle le nombre de cellules intestinales. En effet, la perte de fonction de PAR-4 entraîne la présence d'un excès d'entérocytes, associée à des déformations majeures de la lumière intestinale et à la présence de jonctions apicales additionnelles. J'ai pu montrer que les embryons *cdc-25.1(gof)* présentent des défauts intestinaux similaires, reliés à l'excès d'entérocytes. En suivant les divisions des descendants du blastomère E, mes observations montrent que PAR-4 régule le nombre d'entérocytes, non pas en contrôlant le cycle cellulaire, mais en restreignant le devenir cellulaire du blastomère C notamment. En effet, la perte de fonction de PAR-4 induit l'expression anormale du gène *end-1*, spécifique du lignage E, en particulier dans les descendants de la cellule Cp. Mes résultats préliminaires suggèrent que l'expression de *end-1* en-dehors du lignage E dans les embryons *par-4(it47)* est en partie reliée à la présence de la protéine MED-1 dans le lignage C. Toutefois, l'activation de l'expression de *med-1* semble indépendante de SKN-1 dans les embryons *par-4(it47)*. Mes résultats de thèse montrent également que la perte de fonction de PAR-1 induit un défaut de spécification similaire aux embryons *par-4(it47)* avec une expression de *end-1* dans le lignage Cp, la présence ectopique de MED-1 dans le lignage C et l'absence de stabilisation de SKN-1 dans les blastomères embryonnaires. Pour conclure, mes résultats de thèse révèlent une nouvelle fonction de PAR-4 dans l'embryon *C. elegans* dans la régulation de la spécification du blastomère C par rapport au développement intestinal.

## **I. PAR-4 contribue à la régulation de la taille des microvillosités et des jonctions apicales**

Mes résultats de thèse ont montré que la perte de fonction de PAR-4 n'affecte pas l'établissement de la polarité apico-basale des entérocytes chez le nématode. En effet, les protéines de polarité PAR-6 et LET-413 sont localisées normalement respectivement aux pôles apical et basolatéral dans les embryons *PAR-4*. En revanche, la perte de fonction de PAR-4 conduit à une variabilité de la taille des microvillosités

ainsi que des plus longues jonctions apicales dans les embryons *PAR-4* tardifs. Ces deux phénotypes mineurs ont été observés et quantifiés sur des coupes de MET effectuées par Ophélie Nicolle.

## **1. Rôle mineur de *PAR-4* sur la taille des microvillosités**

### **a. Potentielle implication de certains composants de la bordure en brosse**

Ce phénotype mineur pourrait être entraîné par un défaut de la localisation et/ou de la fonction de l'actine ou des protéines régulatrices du réseau d'actine au sein des microvillosités. Anne Pacquelet a détaillé la localisation de plusieurs composants de la bordure en brosse intestinale, en focalisant son observation dans les embryons contrôles et *par-4(it47)* au stade 2-fold ( $n > 10$  pour chaque condition).

Tout d'abord, l'actine microvillositaire a été observée grâce à un transgène permettant l'expression de l'actine ACT-5 tagguée à la GFP. ACT-5 est spécifiquement exprimée dans l'intestin du nématode. Les embryons *par-4(it47)* ne présentent pas de défaut de la localisation de l'ACT-5. De plus, l'intensité du signal ACT-5::GFP est similaire entre les embryons contrôles et les embryons *par-4(it47)*. Par ailleurs, il a été décrit que la déplétion de EPS-8, une protéine située à la pointe des microvillosités, entraîne une bordure en brosse anormalement irrégulière chez *C. elegans*. Par ailleurs, dans cette condition génétique, les microvillosités sont en moyenne plus longues par rapport aux embryons contrôles. Toutefois, le signal de la protéine EPS-8 fusionnée de manière endogène au fluorochrome mNeonGreen (mNG) dans les embryons *par-4(it47)* est similaire à celui visible dans les embryons contrôles. Pour compléter l'étude, la localisation des composants de la bordure en brosse HUM-5, FLN-2, tous normalement exprimés à la membrane apicale des entérocytes (Bidaud-Meynard et al. 2021), a été caractérisée. Pour cela, des embryons au stade 2-fold exprimant chacun de ces marqueurs fusionnés à leur loci respectifs à un fluorochrome ont été observés. Les embryons *par-4(it47)* au stade 2-fold ne présentent pas de défaut de la localisation de HUM-5 et FLN-2. De plus, l'analyse de la localisation de PLST-1 est en cours au laboratoire. Ces résultats suggèrent que *PAR-4* n'agit pas directement sur ces facteurs, ou du moins sur leur localisation au sein de la bordure en brosse, afin de réguler finement la taille des microvillosités.

Par ailleurs, l'irrégularité de la longueur des microvillosités entraînée par la perte de fonction de *PAR-4* pourrait aussi être liée à un défaut des protocadhérines. Ces protéines relient les microvillosités entre elles et sont capables de réguler la taille des microvillosités (Crawley, Shifrin, et al. 2014; Pinette et al. 2019). Par exemple, les souris déficientes en CDHR2 présentent des microvillosités en moyenne plus

courtes et plus variables en longueur (Pinette et al. 2019). En revanche, chez *C. elegans*, la perte de fonction de la protocadhérine CDH-8 n'influence pas la longueur des microvillosités (Zhu et al. 2022). Ainsi, PAR-4 ne semble pas exercer un rôle sur les protocadhérines.

### **b. Rôle de PAR-4 sur la phosphorylation de l'eitrine ?**

Dans des conditions de suractivation de LKB1 dans des cellules intestinales en culture, il a été décrit que LKB1 est capable d'induire une cascade de signalisation phosphorylant *in fine* l'eitrine et entraînant la formation de microvillosités au pôle apical de ces cellules. Dans l'intestin de *C. elegans*, PAR-4 pourrait être également impliquée dans la régulation de la forme phosphorylée de l'eitrine : phospho-ERM-1. La phosphorylation de ERM-1 n'est pas essentielle à la formation de microvillosités chez *C. elegans* (Ramalho et al. 2020). Toutefois, les larves mutantes pour le site conservé T544 de la phosphorylation de ERM-1 développent des microvillosités raccourcies par rapport aux contrôles (Ramalho et al. 2020). Par ailleurs, dans les embryons porteurs de la mutation T544A, le signal phospho-ERM-1 n'est plus strictement apical comme dans les embryons contrôles, mais est aussi localisé à la membrane basolatérale (Ramalho et al. 2020). Ce phénotype n'étant pas similaire aux défauts observés dans les embryons *par-4(it47)*, PAR-4 ne semble pas agir via la phosphorylation de ERM-1 pour réguler la taille des microvillosités intestinales. Ainsi, alors que la suractivation de LKB1 dans des cellules intestinales en culture humaines est suffisante pour la polarisation apico-basale et la formation de microvillosités, la perte de fonction de PAR-4 chez le nématode ne perturbe pas drastiquement ces deux processus.

### **c. Défauts des microvillosités et développement du nématode**

Les changements significatifs de la taille des microvillosités des embryons *par-4(it47)* ne seraient-ils pas reliés à un blocage de l'élongation des embryons. Ainsi, leur stade développemental serait plus avancé que leur morphologie l'indique. La longueur en moyenne plus longues des microvillosités des embryons *par-4(it47)* soutient cette hypothèse. En effet, les microvillosités s'allongent au cours du développement embryonnaire et larvaire (Bidaud-Meynard et al. 2021). En revanche, les microvillosités sont en moyenne plus fines dans les embryons *par-4(it47)*, ce qui va à l'encontre du processus de maturation des microvillosités qui s'élargissent au contraire dans les embryons et larves contrôles (Bidaud-Meynard et al. 2021). Cela suggère que les défauts mineurs de taille des microvillosités induits par la perte de fonction de PAR-4 sont reliés à un rôle de PAR-4 qui n'est pour l'heure pas élucidé.

Pour terminer sur ce point, il serait également possible de tester la fonctionnalité des microvillosités affectées par la perte de fonction de PAR-4. Pour cela, la localisation de transporteurs exprimés au pôle apical des entérocytes, tels que PEPT-1, pourrait être décrite dans les embryons *par-4(it47)*. Par ailleurs, une autre expérience serait de tester l'absorption de la nourriture chez les larves en analysant leur développement, leur croissance et leur potentielle létalité. Toutefois, il serait auparavant nécessaire de tester si les embryons *par-4(it47)* sont capables d'éclore sans mourir. De plus, ces embryons peuvent présenter des défauts pléiotropiques tels que des défauts de morphogenèse. Une alternative consisterait à dégrader la protéine PAR-4 spécifiquement dans les cellules intestinales pour empêcher l'apparition d'autres défauts.

## **2. Rôle mineur de PAR-4 dans la régulation de la longueur des jonctions apicales**

En plus des variations de la taille des microvillosités, les embryons *par-4(it47)* présentent également des jonctions apicales (CeAJs) plus longues. Il est intéressant que ce phénotype mineur possède des similarités avec la drosophile. En effet, l'œil de clones mutants *lkb1(null)* présente des jonctions adhérentes en moyenne plus longues (Amin et al. 2009). Par ailleurs, certaines jonctions paraissent fragmentées. Chez *C. elegans*, il est connu que LET-413<sup>Scribble</sup> permet la compaction des CeAJs (Legouis et al. 2000; McMahon et al. 2001). Sa déplétion entraîne une perte de polarité apico-basale ainsi que la présence de CeAJs fragmentées dans les cellules intestinales. Je n'ai pas observé ces défauts dans les embryons *par-4(it47)*. Par ailleurs, j'ai montré que la localisation de LET-413 n'est pas perturbée dans l'intestin des embryons *par-4(it47)*. Ces résultats suggèrent que PAR-4 n'agit pas via LET-413 pour réguler la taille des CeAJs dans l'intestin. Cependant, il est possible que PAR-4 exerce un rôle mineur sur un autre composant des jonctions. Des résultats récents décrivent l'expression de AFD-1, un homologue de Afadin<sup>Canoe</sup> au niveau de la partie la plus apicale des jonctions (Pickett et al., 2021). Au laboratoire, nous pourrions observer cette protéine dans les embryons *par-4(it47)* pour caractériser d'éventuels défauts de localisation. De plus, nous pourrions observer en MET l'ultrastructure des jonctions apicales dans des embryons déplétés en AFD-1.

## **3. Localisation de PAR-4 et polarisation des entérocytes**

A l'aide d'une souche de vers exprimant la protéine PAR-4 fusionnée au locus par le fluorochrome mNeonGreen, j'ai noté que PAR-4 est localisée au cortex cellulaire de toutes les cellules embryonnaires,

confirmant des données déjà publiées (Roy et al. 2018). Par ailleurs, aux stades E16 et lima bean, j'ai noté un enrichissement de PAR-4 sur des foci au pôle apical des entérocytes. En observant simultanément la localisation de PAR-4 et de la protéine apicale PAR-3, j'ai mis en évidence que ces foci de PAR-4 sont localisés de manière subapicale par rapport à PAR-3 (données non montrées). Ils sont particulièrement enrichis au niveau des jonctions apicales entre les anneaux intestinaux et aux régions où la lumière intestinale s'ouvre, suggérant une contribution de PAR-4 au cours de ces processus. Ainsi, les défauts mineurs de la structure de la BB et des CeAJs observés dans les embryons *par-4(it47)* sont-ils dus à une fonction de PAR-4 spécifiquement dans les cellules intestinales ? Pour le savoir, nous pourrions utiliser le système de dégradation de la protéine PAR-4 inducible à l'auxine spécifiquement dans les entérocytes. Dans ce système, les vers expriment simultanément deux transgènes : la protéine PAR-4 fusionnée à un locus et à un fluorochrome ainsi que le récepteur à l'auxine TIR-1 sous le contrôle du promoteur *elt-2*, spécifique des cellules intestinales. Ainsi, l'ajout d'auxine induit l'interaction de PAR-4-degron avec TIR-1, entraînant la dégradation de PAR-4 uniquement dans les entérocytes. Comme le gène *elt-2* est exprimé à partir du stade E2, cette expérience permettrait de tester le rôle de PAR-4 dans la différenciation des cellules intestinales. Nous pourrions analyser l'ultrastructure de la membrane apicale développée par les embryons déplétés en PAR-4 dans l'intestin en MET. Si d'éventuels défauts sont similaires à ceux observés dans les embryons *par-4(it47)*, alors cela suggérerait que les défauts de la taille des microvillosités et des jonctions apicales sont directement reliés à une fonction de PAR-4 au sein des entérocytes. Cette expérience pourrait également être utilisée pour confirmer nos résultats sur la polarisation des cellules intestinales. Nous pourrions ainsi générer des souches permettant d'observer la localisation de différents marqueurs de la polarité apico-basale (PAR-6, LET-413, protéines de jonctions) et des composants de la bordure en brosse intestinale (ERM-1, EPS-8, PLST-1, ACT-5...) dans des embryons déplétés en PAR-4 dans les entérocytes.

## II. Conséquences développementales d'un excès d'entérocytes

### 1. Dans les larves

Mes résultats de thèse montrent que la perte de fonction de PAR-4 entraîne l'apparition de déformations de la lumière intestinale à la fin de l'embryogenèse. Si les embryons *par-4(it47)* survivent et sont capables d'éclore, ou dans le cas contraire, en utilisant le système de dégradation de PAR-4 dans l'intestin, alors nous pourrions analyser la présence de ces défauts dans les larves : se sont-ils atténués ou

persistent-ils ? Pour déterminer si la lumière intestinale est continue comme chez les larves contrôles, nous pourrions effectuer un test nommé « *Smurf assay* » qui consiste à faire ingérer aux larves un colorant bleu (Pickett M. et al., 2021; Sallee et al., 2021). De cette manière, il est possible de visualiser d'éventuelles obstructions intestinales. En parallèle, l'expérience pourrait être réalisée également dans les larves *cdc-25.1(gof)* qui se développent normalement malgré les déformations de la lumière visibles aux stades embryonnaires tardifs et dont le phénotype larvaire n'a pas été caractérisé.

## **2. Formation de la lumière intestinale**

Par ailleurs, la présence d'un excès d'entérocytes soulève de nombreuses questions développementales. Tout d'abord, comment la lumière intestinale s'ouvre-t-elle lorsqu'un nombre aberrant d'entérocytes constitue l'épithélium ? En MET, nous pourrions comparer la morphologie de la lumière intestinale depuis le stade lima bean jusqu'aux stades 3-4-fold entre les embryons contrôles et les embryons *par-4(it47)* (Bidaud-Meynard et al. 2021). Par ailleurs, mes résultats de thèse montrent que les déformations majeures de la lumière intestinale dans les embryons *par-4(it47)* sont visibles en microscope confocale à fluorescence dans les embryons aux stades 3 et 4-fold mais pas dans les embryons au stade 2-fold. Comment expliquer ce décalage temporel de l'apparition des défauts de la lumière ? Pendant l'élongation de l'embryon, et par extension de l'intestin, la lumière s'élargit selon l'axe gauche-droite de l'organisme (Bidaud-Meynard et al. 2021). Cet élargissement est visible sur les coupes transversales effectuées en MET (Bidaud-Meynard et al. 2021). De plus, le pôle apical devient aussi plus large via un élargissement des entérocytes selon l'axe antéro-postérieur. Ainsi, il est possible que puisque la lumière s'élargit au cours de l'embryogenèse, les déformations de lumière s'amplifient et deviennent observables (Bidaud-Meynard et al. 2021). Pour vérifier les résultats, il serait nécessaire de caractériser la morphologie de la lumière intestinale dans les embryons *par-4(it47)* au stade 2-fold par MET.

## **3. Organisation des cellules intestinales au sein du tissu**

### **a. Dans les embryons tardifs**

De plus, comment les cellules intestinales surnuméraires s'organisent-elles pour former un épithélium intègre ? En 2017, Choi et ses collaborateurs ont décrit l'organisation des entérocytes au sein d'embryons *cdc-25.1(rr31)* aux stades lima bean et 1.5-fold via l'observation de marqueurs des membranes et des noyaux des cellules intestinales (Choi et al. 2017). Ils ont remarqué que les entérocytes

additionnels dans les embryons *cdc-25.1(rr31)* au stade 1.5-fold forment des anneaux intestinaux supplémentaires et/ou des anneaux formés de plus de deux cellules (hors anneau le plus antérieur) (Choi et al. 2017). Nos observations en microscopie confocale à fluorescence via le marqueur *vha-6p::PH::GFP* et en MET ont confirmé la présence d'anneaux formés de plus de deux, jusqu'à quatre ou cinq, quatre cellules dans les embryons *cdc-25.1(rr31)*. Par ailleurs, nous avons également mis en évidence que les embryons *par-4(it47)* présentent un phénotype similaire. Afin de déterminer si les cellules intestinales surnuméraires peuvent également s'organiser en anneaux supplémentaires dans les embryons *par-4(it47)*, j'ai observé un marqueur des membranes des entérocytes au stade 2-fold, puis effectué une reconstruction en 3D via le logiciel d'analyse d'image Imaris (données non montrées). Mes résultats préliminaires suggèrent que les cellules intestinales surnuméraires peuvent élaborer des anneaux supplémentaires, en plus des anneaux formés de plus de deux cellules. J'ai également effectué cette analyse dans les embryons *cdc-25.1(rr31)* au stade 2-fold, confirmant les résultats publiés. Ainsi, les embryons *par-4(it47)* et *cdc-25.1(rr31)* présentent un phénotype final similaire vis-à-vis de l'organisation des cellules intestinales surnuméraires dans le tissu.

### **b. Au cours du développement intestinal**

En revanche, j'ai montré que l'origine de l'excès d'entérocytes diffère entre la perte de fonction de PAR-4 et le gain de fonction de CDC-25.1. Alors que la phosphatase CDC-25.1 contrôle le cycle cellulaire et le nombre de divisions intestinales, la protéine PAR-4 restreint le devenir cellulaire du blastomère embryonnaire C pour l'empêcher d'adopter une identité intestinale. Mes résultats de thèse suggèrent que les cellules intestinales surnuméraires des embryons *par-4(it47)* s'intercalent entre les entérocytes issus du lignage E. Comment ce processus se déroule-t-il au cours de l'organogenèse de l'épithélium intestinal ? Il serait intéressant de décrire les réarrangements des cellules intestinales au cours du développement dans les embryons *par-4(it47)* et les comparer aux embryons contrôles. Pour cela, nous pourrions filmer le développement de l'intestin dans des embryons exprimant simultanément un marqueur membranaire de toutes les cellules embryonnaires, un marqueur des noyaux intestinaux ainsi qu'un marqueur de la bordure en brosse. Ensuite, une segmentation des cellules au cours du temps pourrait être effectuée afin de visualiser en trois dimensions l'organisation des descendants de E au sein du tissu et de l'embryon, de façon similaire à Asan et ses collaborateurs (Asan et al. 2016). Cette analyse permettrait de caractériser les réarrangements cellulaires des cellules localisées en-dehors et anormalement spécifiées en cellules intestinales dans les embryons *par-4(it47)*.

Les entérocytes des embryons contrôles subissent des réarrangements cellulaires tels que l'intercalation des anneaux int2 et int5 mais aussi les rotations des anneaux int2 à int4 (Asan et al. 2016). Ces réarrangements cellulaires concernent-ils les mêmes anneaux dans les embryons *par-4(it47)* présentant un excès de cellules intestinales ? Cela suggérerait que l'expression génétique le long de l'intestin, qui régule ces réarrangements, est conservée malgré l'excès de cellules intestinales. L'expérience proposée ci-dessus permettrait également d'observer la formation de la lumière intestinale via le marqueur de la bordure en brosse dans un contexte d'excès d'entérocytes. En outre, au stade « E16 », il serait intéressant de déterminer si toutes les cellules intestinales, en excès, contactent la ligne médiane, localisée au centre de l'intestin, avec leur pôle apical. Certaines coupes de l'intestin des embryons *par-4(it47)* au stade 3-4-fold en MET montrent l'organisation des cellules intestinales surnuméraires : leurs pôles apicaux sont de largeur variable, mais ils contactent tous la lumière intestinale. Il serait intéressant de déterminer le stade développemental au cours duquel les entérocytes surnuméraires s'intercalent.

### **III. Régulation de la spécification des blastomères embryonnaires par PAR-4 et PAR-1**

Les expériences de lignage des descendants de E dans les embryons *par-4(it47)* ont montré que PAR-4 n'est pas impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire des cellules intestinales. A l'opposé, elle est décrite comme un régulateur du cycle cellulaire dans l'embryon 2-cellules via CDC-25.1. Ainsi, PAR-4 exerce des fonctions distinctes au cours de l'embryogenèse du nématode.

#### **1. Rôle de PAR-4 sur l'expression de *end-1* et *elt-2***

Mes résultats de thèse révèlent un nouveau rôle de PAR-4 dans la régulation de la spécification du blastomère C. En effet, la perte de fonction de PAR-4 induit l'expression du gène *end-1* dans des cellules qui ne proviennent pas du lignage intestinal. Le gène *end-1* est un des premiers gènes à être exprimé dans le blastomère E, induisant la spécification du lignage vers l'identité intestinale. Dans les embryons contrôles, la présence de END-1 induit ensuite l'expression de *elt-2*, le facteur de transcription essentiel à la différenciation intestinale. Dans les embryons *par-4(it47)*, j'ai mis en évidence que les cellules ectopiques, issues à l'origine du lignage C, peuvent ensuite exprimer ou non *elt-2*. Ainsi, il semble que la

perte de fonction de PAR-4 génère de la variabilité au niveau de l'expression de *elt-2*. Ces résultats ont été décrits dans des embryons exprimant simultanément deux transgènes fusionnés à la GFP dont l'intensité de signal diffère : le marqueur *end-1* est d'intensité faible tandis que le marqueur *elt-2* a une forte intensité. Nous pourrions confirmer ces résultats en utilisant deux transgènes permettant l'expression de protéines fluorescentes pouvant être distinguées via deux filtres distincts à l'acquisition au microscope. De cette manière, il sera plus aisé de visualiser le nombre de cellules exprimant *end-1*, puis compter le nombre d'entre elles exprimant ensuite *elt-2*. Par ailleurs, cela permettrait également de mieux décrire une éventuelle variabilité d'expression de *end-1* avant que le transgène *elt-2* ne soit exprimé. Ainsi, nous pourrions caractériser la variabilité d'expression génétique et distinguer l'étape de spécification intestinale (END-1) et celle de différenciation intestinale (ELT-2), de manière similaire au travail réalisé Choi et ses collaborateurs (Choi et al. 2017)

Cependant, les transgènes utilisés correspondent à des rapporteurs transcriptionnels permettant de suivre l'expression de *end-1* ou de *elt-2*. Ainsi, il serait intéressant de décrire le phénotype de la perte de fonction de PAR-4 au niveau des protéines END-1 et ELT-2. Pour cela, des souches de vers exprimant les protéines END-1 et ELT-2 fusionnées de manière endogène à un fluorochrome sont disponibles au laboratoire. L'observation de la protéine endogène fluorescente END-1 dans les embryons *par-4(it47)* permettrait de vérifier que la perte de fonction de PAR-4 entraîne non seulement l'expression de *end-1*, mais aussi la présence ectopique de la protéine END-1. Cette observation pourrait également permettre de mesurer les niveaux protéiques de END-1 dans le lignage C, mais aussi dans le lignage E. De plus, l'observation de la protéine endogène fluorescente ELT-2 permettrait de confirmer la présence d'un excès de cellules intestinales différenciées dans les embryons *par-4(it47)*. Par ailleurs, ces souches exprimant les facteurs fluorescents END-1 et ELT-2 de manière endogène pourront également être utilisées afin de caractériser le lien éventuel entre la variabilité des niveaux protéiques de END-1 et la capacité des cellules à exprimer *elt-2*. Une étude a montré que l'expression de *end-1* doit atteindre un seuil critique nécessaire à l'activation de l'expression de *elt-2* (Raj et al. 2010). De plus, comme il a été montré que END-3 est capable d'activer l'expression de *end-1* (Maduro et al. 2007), il serait intéressant de décrire son expression dans les embryons *par-4(it47)*. Pour ce faire, nous pourrions observer des embryons exprimant le facteur END-3 fusionnée de manière endogène à un fluorochrome afin de confirmer ces résultats.

Dans les embryons *par-4(it47)*, mes résultats de thèse montrent une variabilité de l'expression de *elt-2* au sein des descendants de C mais également dans le lignage E : *elt-2* n'est pas toujours exprimé dans tous les descendants de E. Comme pour la description du phénotype dans le lignage C, il serait intéressant

de décrire si la variabilité de l'expression de *elt-2* est corrélée aux niveaux protéiques de END-1 ou END-3. Ces résultats au sein du lignage E rappellent les premières données publiées sur la description du rôle de PAR-4 dans l'embryon du nématode (Morton et al. 1992). Il a été décrit que la perte de fonction de PAR-4 induit une absence de granules intestinaux visibles en lumière polarisée (Morton et al. 1992). Ces granules sont visibles dans des cellules intestinales différenciées. Ces expériences ont été effectuées suite à une longue perte de fonction de PAR-4 dans des mutants thermosensibles *PAR-4*, voire dans des embryons mutants *par-4(null)* (Morton et al. 1992). Nous pourrions donc décrire l'expression de END-1 et ELT-2 dans les embryons *par-4(it47)* dans ces conditions d'inactivation longue en amont. Si les embryons *par-4(it47)* ne présentent pas de signal de protéines END-1 fluorescentes, alors la perte de fonction de PAR-4 empêche strictement la spécification intestinale. Toutefois, il est possible que la protéine END-1 soit présente dans les descendants de E, mais en plus faibles niveaux protéiques, qui ne soient pas suffisants pour induire *in fine* l'expression du *elt-2*, entraînant ainsi l'absence de cellules intestinales différenciées.

## **2. Quelles sont les voies de signalisation impliquées ?**

### **a. PAR-1 régule également la spécification du blastomère C**

Au cours de ma thèse, j'ai commencé à explorer les mécanismes moléculaires par lesquels PAR-4 peut agir dans les blastomères embryonnaires, notamment dans le blastomère C. J'ai montré que la perte de fonction de PAR-1 induit un défaut d'identité cellulaire similaire aux embryons *par-4(it47)*. Pour compléter l'étude, il serait intéressant de caractériser le lignage intestinal dans les embryons *par-1(zu310)* pour tester si PAR-1 est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire dans ce contexte. La spécification intestinale repose sur une cascade de signalisation impliquant un réseau de multiples facteurs de transcription. La protéine SKN-1 a été montrée comme étant en amont de cette cascade : elle active l'expression des gènes *med-1,2*, qui induisent à leur tour l'expression des gènes *end-1,3*. Il a été montré précédemment que l'expression de SKN-1 et/ou MED-1 est suffisante pour convertir des blastomères non issus de EMS en précurseurs du mésendoderme (Maduro et al. 2001).

### **b. Implication de MED-1**

Mes données préliminaires suggèrent que la protéine MED-1 est anormalement présente dans les cellules filles du blastomère C, Ca et Cp, dans les embryons *par-4(it47)*. Toutefois, ces données nécessitent d'être complétées par un nombre d'embryons observés plus important pour confirmer ces conclusions.

Mon jeu de données dans les embryons *par-1(zu310)* étant plus fourni, il est possible de conclure que la perte de fonction de PAR-1 induit la présence de MED-1, associée à l'expression de *end-1*, dans le lignage C.

### c. Implication de SKN-1

Afin de poursuivre la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus, j'ai analysé la localisation de SKN-1. Pour cela, une souche exprimant la protéine SKN-1 fusionnée au locus à la GFP a été utilisée. Au contraire de ce qui est décrit dans la littérature via des expériences d'immunomarquage (Bowerman et al. 1993, 1992), l'étude de la dynamique des protéines SKN-1 endogènes a révélé une absence d'asymétrie protéique. SKN-1 est enrichie dans les noyaux des cellules AB et P1 au stade 2-cellules, puis dans tout ou partie des quatre blastomères au stade 4-cellules avant de ne plus être détectée au stade 8-cellules. Par ailleurs, mes résultats de thèse révèlent suggèrent que les pertes de fonction de PAR-1 et PAR-4 ne conduisent pas à la stabilisation de la protéine SKN-1 dans le blastomère C. Toutefois, il serait nécessaire de compléter cette analyse en effectuant des films dans les embryons *par-4(it47)* pour visualiser la dynamique de SKN-1 au cours de l'embryogenèse précoce.

Ainsi, ces observations suggèrent l'existence d'une voie de signalisation induisant l'expression de *med-1* qui n'implique pas la stabilisation de SKN-1. Cela contraste avec les phénotypes décrits des embryons déplétés en GSK-3 ou LIN-23 ou les embryons *oma-1(gof)* qui présentent tous une stabilisation anormale de la protéine SKN-1 au sein du blastomère C notamment (Hebeisen and Roy 2008; Lin 2003; Maduro et al. 2001; Shirayama et al. 2006). De plus, un rôle de PAR-1 sur la régulation de l'asymétrie de SKN-1 dans les embryons 2-cellules et 4-cellules avait été démontré (Guo and Kemphues 1995). En revanche, nous ne pouvons pas exclure un effet activateur de la perte de fonction de PAR-1 ou PAR-4 sur l'activité de SKN-1 dans le blastomère C, indépendamment de ses niveaux protéiques, conduisant à l'expression anormale de *med-1* dans ce lignage.

### d. Un autre régulateur possible : PAL-1

Il a été proposé que le ratio protéique SKN-1:PAL-1 est important pour la spécification du blastomère C (Maduro et al. 2001). PAL est un facteur de transcription impliqué dans la spécification du lignage C mais qui joue également un rôle de régulateur positif de la spécification intestinale dans le blastomère E (Bowerman et al. 1997; Hunter and Kenyon 1996; Maduro, Kasmir, et al. 2005). Dans la

littérature, les embryons *PAR-4* et *par-1* présentent une absence de signal PAL-1 (Bowerman et al., 1997; Hunter & Kenyon, 1996). Ainsi, il serait nécessaire de décrire les niveaux protéiques de PAL-1 dans les embryons *par-4(it47)* et *par-1(zu310)*. Il est possible que ceux-ci présentent une absence ou une diminution de PAL-1 au sein du blastomère C. Dans ce cas, même une faible quantité de protéines SKN-1 présente dans le blastomère C pourrait suffire à activer l'expression de *med-1*. Ainsi, le ratio SKN-1/PAL-1 serait déséquilibré en faveur de SKN-1 et de l'induction de la spécification intestinale.

#### e. Expériences pour tester l'implication SKN-1 et PAL-1

Afin de tester l'implication de SKN-1 dans la conversion du blastomère C en précurseur de l'endoderme dans les embryons *par-4(it47)* et *par-1(zu310)*, nous pourrions tester l'effet d'une déplétion partielle de SKN-1 par interférence à l'ARN. Si les embryons ne présentent plus de signal ectopique, cela indiquerait que le défaut de spécification du blastomère C est dépendant de SKN-1. Par ailleurs, si les niveaux protéiques de PAL-1 sont diminués voire absents dans les embryons *par-4(it47)* et *par-1(zu310)*, nous pourrions tester l'effet d'une réactivation de l'expression de *pal-1*. La traduction de PAL-1 est contrôlée par la protéine MEX-3 (Draper et al. 1996; Huang et al. 2002). En effet, l'absence de MEX-3 entraîne la présence de PAL-1 dans toutes les cellules embryonnaires (Hunter and Kenyon 1996). Par ailleurs, il a été montré que PAR-4 et PAR-1 sont capables de promouvoir PAL-1 en inhibant l'activité de *mex-3* (Huang et al. 2002). La double perte de fonction PAR-4 et MEX-3 rétablit l'expression de PAL-1 (Huang et al. 2002). Ainsi, nous pourrions analyser le devenir du blastomère C et de ses descendants dans les doubles mutants *par-4 ; mex-3*. Si les embryons ne présentent plus de signal ectopique, cela signifierait que le défaut de spécification du blastomère C est relié à une absence de PAL-1. La caractérisation de l'effet de la déplétion de SKN-1 ou de la restauration de l'expression de PAL-1 dans les embryons *par-4(it47)* et *par-1(zu310)* peut être effectuée sur la base de l'apparition du signal *end-1* dans des cellules du lignage C.

Par ailleurs, la signalisation intercellulaire impliquée pour la spécification du blastomère EMS au stade 4-cellules pourrait également être impliquée. En effet, dans les embryons déplétés en GSK-3, il a été proposé que le blastomère C adoptait un destin cellulaire similaire à EMS (Maduro et al. 2001). En effet, ces embryons *gsk-3(ARNi)* présentent des niveaux nucléaires de POP-1 asymétriques dans le lignage C similaires à ceux retrouvés dans les cellules filles de EMS, MS et E. Ainsi, le noyau de Ca montre un enrichissement plus élevé en POP-1 par rapport au noyau de Cp (Maduro et al. 2001). Toutefois, la cellule Ca ne produit pas des tissus dérivés de MS lors de la déplétion de GSK-3. En revanche, la cellule Ca des

embryons déplétés en GSK-3 et en PAL-1 adopte un destin similaire à la cellule MS. Cette asymétrie similaire aux cellules filles de MS suggère l'existence d'une signalisation intercellulaire provenant du blastomère P3 vers C. En effet, la cellule Cp provient de la région du blastomère C qui était en contact avec le blastomère P3, de la même façon que la signalisation P2 vers EMS. Il est intéressant de noter que dans les la protéine POP-1 s'accumule asymétriquement dans les cellules C et P3, avec la cellule antérieure C présentant un plus fort niveau protéique que P3 (Lin et al. 1995; Thorpe et al. 1997). De plus, dans les embryons mutants *pie-1*, le blastomère C adopte un destin similaire à MS tandis que le blastomère P3 se convertit en précurseur de l'endoderme (Thorpe et al. 1997). Dans ce contexte génétique, les faibles niveaux protéiques de POP-1, activateurs de l'expression des gènes intestinaux, suffisent à la spécification du blastomère P3 vers une identité cellulaire similaire au blastomère E (Thorpe et al. 1997). Les niveaux de POP-1 n'ont pas été caractérisés dans les cellules filles du blastomère C. Toutefois, dans la continuité, il est possible qu'il existe une asymétrie antéro-postérieure de POP-1, avec un enrichissement de POP-1 plus fort dans Ca par rapport à Cp. Dans un contexte sensibilisé par une autre dérégulation, par exemple une augmentation de l'activité de SKN-1 ou une diminution de la présence de PAL-1, POP-1 pourrait contribuer à l'expression de *end-1* dans les descendants de Cp dans les embryons *par-4(it47)* et *par-1(zu310)*.

### **3. Caractérisation fine du devenir des descendants de C qui adoptent un destin intestinal**

#### **a. Rythme de divisions**

Afin de définir le devenir des descendants de C dans les embryons *par-4(it47)* et *par-1(zu310)*, des expériences d'isolation de blastomères pourraient être réalisées. Par exemple, nous pourrions isoler le blastomère C des embryons *par-4(it47)* et *par-1(zu310)* et caractériser le devenir cellulaire de leurs descendants en effectuant des immunomarquages de facteurs spécifiques de l'intestin différencié, par exemple IFB-2. Il serait également intéressant de déterminer si les descendants du lignage C qui expriment ectopiquement *end-1* et *elt-2* adoptent un comportement similaire aux descendants de E, à savoir un rythme de division particulièrement lent. Pour cela, nous pourrions caractériser finement leur lignage. Afin de distinguer plus aisément les descendants de E des descendants de C sur les films de lignage, une méthode de segmentation puis de suivi des noyaux au cours du temps pourrait être établie. J'ai commencé cette analyse avec l'aide de Thierry Pécot (plateforme Biosit) et d'outils de « *deep-learning* ». Toutefois, mes films de lignage actuels ne sont pas idéaux pour ce type d'analyse. En effet, les signaux des noyaux

des entérocytes sont d'intensité très variable entre l'expression de *end-1* et celle de *elt-2* au cours du temps. Ainsi, il serait préférable que les embryons expriment les protéines fluorescentes endogènes END-1 et ELT-2, désormais disponibles au laboratoire. Par ailleurs, pour faciliter la segmentation, il serait nécessaire que les embryons expriment un marqueur nucléaire de toutes les cellules embryonnaires.

### **b. Changement d'identité cellulaire**

Enfin, mes résultats de thèse montrent que certains descendants du blastomère C expriment les facteurs MED-1, END-1 et ELT-2 normalement spécifiquement exprimés par le lignage intestinal. L'expression de ces marqueurs intestinaux suggère un changement d'identité cellulaire. Réciproquement, il serait intéressant de déterminer si ces cellules perdent l'expression de marqueurs spécifiques du lignage C. Un problème se présente à nous : il n'existe pas de facteurs spécifiquement exprimés dans le lignage du blastomère C. En effet, celui-ci produit des cellules de la peau et de muscles. Les deux descendants de C, Ca et Cp, donnent naissance à des lignages symétriques et équivalents selon l'axe gauche-droite (Edgar et al. 2001; Hunter and Kenyon 1996; Stigler and Chamberlin 2012). Dans l'embryon 28-cellules, juste après que la gastrulation ne soit initiée via la migration de Ea et Ep, l'embryon possède quatre descendants de C : Caa, Cap, Cpa et Cpp. Les descendants de Caa et Cpa donnent naissance à l'épiderme dorsal tandis que les descendants de Cap et Cpp produisent des cellules musculaires. Il serait trop compliqué d'observer des marqueurs généraux de ces tissus et de caractériser d'éventuelles absences cellulaires. Ainsi, j'ai recherché des marqueurs exprimés dans une partie du lignage C. Les facteurs transcription TBX-8 et TBX-9 sont exprimés dans les cellules Ca et Cp ainsi que dans les cellules Ea et Ep, trois descendants de AB destinés à de l'hypoderme et quatre descendants de MS destinés à du muscle (Andachi 2004; Pocock et al. 2004). Par ailleurs, la protéine VAB-7 est spécifiquement exprimée dans les cellules Caaap, Capp, Cpap et Cppp (Ahringer 1996). L'expression de VAB-7 est induite par PAL-1 et TXB-8/TBX-9 qui fonctionnent dans des voies parallèles. Nous pourrions effectuer des films de lignage dans des embryons exprimant simultanément les protéines fluorescentes TBX-8/TBX-9 ou VAB-7 et un marqueur transcriptionnel *end-1*. Cette expérience permettrait de décrire si l'expression de *end-1* est associée à la perte de l'expression de ces marqueurs du lignage C.

# Références bibliographiques

- Achilleos, Annita, Ann M. Wehman, and Jeremy Nance. 2010. "PAR-3 Mediates the Initial Clustering and Apical Localization of Junction and Polarity Proteins during *C. Elegans* Intestinal Epithelial Cell Polarization." *Development* 137(11):1833–42. doi: 10.1242/dev.047647.
- Ahringer, J. 1996. "Posterior Patterning by the *Caenorhabditis Elegans* Even-Skipped Homolog Vab-7." *Genes & Development* 10(9):1120–30. doi: 10.1101/gad.10.9.1120.
- Alessi, Dario R., Kei Sakamoto, and Jose R. Bayascas. 2006. "LKB1-Dependent Signaling Pathways." *Annual Review of Biochemistry* 75:137–63.
- Ameen, N. A., Y. Figueroa, and P. J. Salas. 2001. "Anomalous Apical Plasma Membrane Phenotype in CK8-Deficient Mice Indicates a Novel Role for Intermediate Filaments in the Polarization of Simple Epithelia." *Journal of Cell Science* 114(Pt 3):563–75. doi: 10.1242/jcs.114.3.563.
- Amin, Nancy, Afifa Khan, Daniel St Johnston, Ian Tomlinson, Sophie Martin, Jay Brenman, and Helen McNeill. 2009. "LKB1 Regulates Polarity Remodeling and Adherens Junction Formation in the *Drosophila* Eye." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(22):8941–46. doi: 10.1073/pnas.0812469106.
- An, Jae Hyung, and T. Keith Blackwell. 2003. "SKN-1 Links *C. Elegans* Mesendodermal Specification to a Conserved Oxidative Stress Response." *Genes and Development* 17(15):1882–93. doi: 10.1101/gad.1107803.
- An, Jae Hyung, Kelly Vranas, Michael Lucke, Hideki Inoue, Naoki Hisamoto, Kunihiro Matsumoto, and T. Keith Blackwell. 2005. "Regulation of the *Caenorhabditis Elegans* Oxidative Stress Defense Protein SKN-1 by Glycogen Synthase Kinase-3." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(45):16275–80. doi: 10.1073/pnas.0508105102.
- Andachi, Yoshiki. 2004. "*Caenorhabditis Elegans* T-Box Genes Tbx-9 and Tbx-8 Are Required for Formation of Hypodermis and Body-Wall Muscle in Embryogenesis." *Genes to Cells* 9(4):331–44. doi: 10.1111/J.1356-9597.2004.00725.X.
- Apodaca, Gerard. 2018. "Role of Polarity Proteins in the Generation and Organization of Apical Surface Protrusions." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10(1). doi: 10.1101/cshperspect.a027813.
- de Arruda, M. v, S. Watson, C. S. Lin, J. Leavitt, and P. Matsudaira. 1990. "Fimbrin Is a Homologue of the Cytoplasmic Phosphoprotein Plastin and Has Domains Homologous with Calmodulin and Actin Gelation Proteins." *Journal of Cell Biology* 111(3):1069–79. doi: 10.1083/jcb.111.3.1069.
- Asada, Naoyuki, and Kamon Sanada. 2010. "LKB1-Mediated Spatial Control of GSK3 $\beta$  and Adenomatous Polyposis Coli Contributes to Centrosomal Forward Movement and Neuronal Migration in the Developing Neocortex." *Journal of Neuroscience* 30(26):8852–64. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6140-09.2010.
- Asan, Alparsan, Stephan A. Raiders, and James R. Priess. 2016. "Morphogenesis of the *C. Elegans* Intestine Involves Axon Guidance Genes." *PLoS Genetics* 12(4). doi: 10.1371/journal.pgen.1005950.
- Ashcroft, N. R., M. E. Kosinski, D. Wickramasinghe, P. J. Donovan, and A. Golden. 1998. "The Four Cdc25 Genes from the Nematode *Caenorhabditis Elegans*." *Gene* 214(1–2):59–66. doi: 10.1016/s0378-1119(98)00228-5.

- Ashcroft, Neville R., Martin Srayko, Mary E. Kosinski, Paul E. Mains, and Andy Golden. 1999. "RNA-Mediated Interference of a Cdc25 Homolog in *Caenorhabditis Elegans* Results in Defects in the Embryonic Cortical Membrane, Meiosis, and Mitosis." *Developmental Biology* 206(1):15–32. doi: 10.1006/DBIO.1998.9135.
- Baas, A. F., J. Boudeau, G. P. Sapkota, L. Smit, R. Medema, N. A. Morrice, D. R. Alessi, and H. C. Clevers. 2003. "Activation of the Tumour Suppressor Kinase LKB1 by the STE20-like Pseudokinase STRAD." *The EMBO Journal* 22(12):3062–72. doi: 10.1093/emboj/cdg292.
- Baas, Annette F., Jeroen Kuipers, Nicole N. van der Wel, Eduard Batlle, Henk K. Koerten, Peter J. Peters, and Hans C. Clevers. 2004. "Complete Polarization of Single Intestinal Epithelial Cells upon Activation of LKB1 by STRAD." *Cell* 116(3):457–66. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00114-x.
- Baker, J. P., and M. A. Titus. 1997. "A Family of Unconventional Myosins from the Nematode *Caenorhabditis Elegans*." *Journal of Molecular Biology* 272(4):523–35. doi: 10.1006/jmbi.1997.1232.
- BAKER, JOHN R. 1942. "The Free Border of The Intestinal Epithelial Cell of Vertebrates." *Journal of Cell Science* s2-84(333):73–103. doi: 10.1242/jcs.s2-84.333.73.
- Bao, Zhirong, Zhongying Zhao, Thomas J. Boyle, John I. Murray, and Robert H. Waterston. 2008. "Control of Cell Cycle Timing during *C. Elegans* Embryogenesis." *Developmental Biology* 318(1):65–72. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.02.054.
- Bardeesy, Nabeel, Manisha Sinha, Aram F. Hezel, Sabina Signoretti, Nathaniel A. Hathaway, Norman E. Sharpless, Massimo Loda, Daniel R. Carrasco, and Ronald A. DePinho. 2002. "Loss of the Lkb1 Tumour Suppressor Provokes Intestinal Polyposis but Resistance to Transformation." *Nature* 419(6903):162–67. doi: 10.1038/NATURE01045.
- Beatty, Alexander, Diane Morton, and Kenneth Kemphues. 2010. "The *C. Elegans* Homolog of *Drosophila* Lethal Giant Larvae Functions Redundantly with PAR-2 to Maintain Polarity in the Early Embryo." *Development* 137(23):3995–4004. doi: 10.1242/dev.056028.
- Bei, Yanxia, Jennifer Hogan, Laura A. Berkowitz, Martha Soto, Christian E. Rocheleau, Ka Ming Pang, John Collins, and Craig C. Mello. 2002. "SRC-1 and Wnt Signaling Act Together to Specify Endoderm and to Control Cleavage Orientation in Early *C. Elegans* Embryos." *Developmental Cell* 3(1):113–25. doi: 10.1016/s1534-5807(02)00185-5.
- Benesh, Andrew E., Rajalakshmi Nambiar, Russell E. McConnell, Suli Mao, David L. Tabb, and Matthew J. Tyska. 2010. "Differential Localization and Dynamics of Class I Myosins in the Enterocyte Microvillus." *Molecular Biology of the Cell* 21:970–78. doi: 10.1091/mbc.E09.
- Benkemoun, Laura, Catherine Descoteaux, Nicolas T. Chartier, Lionel Pintard, and Jean Claude Labbé. 2014. "PAR-4/LKB1 Regulates DNA Replication during Asynchronous Division of the Early *C. Elegans* Embryo." *Journal of Cell Biology* 205(4):447–55. doi: 10.1083/jcb.201312029.
- Bernadskaya, Yelena Y., Falshruti B. Patel, Hsiao Ting Hsu, and Martha C. Soto. 2011. "Arp2/3 Promotes Junction Formation and Maintenance in the *Caenorhabditis Elegans* Intestine by Regulating Membrane Association of Apical Proteins." *Molecular Biology of the Cell* 22(16):2886–99. doi: 10.1091/mbc.E10-10-0862.

- Berryman, M., Z. Franck, and A. Bretscher. 1993. "Ezrin Is Concentrated in the Apical Microvilli of a Wide Variety of Epithelial Cells Whereas Moesin Is Found Primarily in Endothelial Cells." *Journal of Cell Science* 105(4):1025–43. doi: 10.1242/jcs.105.4.1025.
- Beumer, Joep, and Hans Clevers. 2021. "Cell Fate Specification and Differentiation in the Adult Mammalian Intestine." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 22(1):39–53.
- Bidaud-Meynard, Aurélien, Flora Demouchy, Ophélie Nicolle, Anne Pacquelet, Shashi Kumar Suman, Camille N. Plancke, François B. Robin, and Grégoire Michaux. 2021. "High-Resolution Dynamic Mapping of the *C. Elegans* Intestinal Brush Border." *Development (Cambridge)* 148(23). doi: 10.1242/dev.200029.
- Boeck, Max E., Tom Boyle, Zhirong Bao, John Murray, Barbara Mericle, and Robert Waterston. 2011. "Specific Roles for the GATA Transcription Factors End-1 and End-3 during *C. Elegans* E-Lineage Development." *Developmental Biology* 358(2):345–55. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.08.002.
- Bonaccorsi, Silvia, Violaine Mottier, Maria Grazia Giansanti, Bonnie J. Bolkan, Byron Williams, Michael L. Goldberg, and Maurizio Gatti. 2007. "The *Drosophila* Lkb1 Kinase Is Required for Spindle Formation and Asymmetric Neuroblast Division." *Development* 134(11):2183–93. doi: 10.1242/dev.02848.
- Bossinger, Olaf, Tetsunari Fukushige, Myriam Claeys, Gaetan Borgonie, and James D. McGhee. 2004. "The Apical Disposition of the *Caenorhabditis Elegans* Intestinal Terminal Web Is Maintained by LET-413." *Developmental Biology* 268(2):448–56. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.01.003.
- Bossinger, Olaf, Ansgar Klebes, Christoph Segbert, Carin Theres, and Elisabeth Knust. 2001. "Zonula Adherens Formation in *Caenorhabditis Elegans* Requires Dlg-1, the Homologue of the *Drosophila* Gene Discs Large." *Developmental Biology* 230(1):29–42. doi: 10.1006/dbio.2000.0113.
- Boudeau, Jérôme, Annette F. Baas, Maria Deak, Nick A. Morrice, Agnieszka Kieloch, Mike Schutkowski, Alan R. Prescott, Hans C. Clevers, and Dario R. Alessi. 2003. "MO25alpha/Beta Interact with STRADalpha/Beta Enhancing Their Ability to Bind, Activate and Localize LKB1 in the Cytoplasm." *The EMBO Journal* 22(19):5102–14. doi: 10.1093/emboj/cdg490.
- Bourouh, Mohammed, and Paola A. Marignani. 2022. "The Tumor Suppressor Kinase LKB1: Metabolic Nexus." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10. doi: 10.3389/fcell.2022.881297.
- Bowerman, B. 1995. "Determinants of Blastomere Identity in the Early *C. Elegans* Embryo." *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 17(5):405–14. doi: 10.1002/bies.950170508.
- Bowerman, B., B. W. Draper, C. C. Mello, and J. R. Priess. 1993. "The Maternal Gene Skn-1 Encodes a Protein That Is Distributed Unequally in Early *C. Elegans* Embryos." *Cell* 74(3):443–52. doi: 10.1016/0092-8674(93)80046-h.
- Bowerman, B., B. A. Eaton, and J. R. Priess. 1992. "Skn-1, a Maternally Expressed Gene Required to Specify the Fate of Ventral Blastomeres in the Early *C. Elegans* Embryo." *Cell* 68(6):1061–75. doi: 10.1016/0092-8674(92)90078-q.

- Bowerman, B., M. K. Ingram, and C. P. Hunter. 1997. "The Maternal Par Genes and the Segregation of Cell Fate Specification Activities in Early *Caenorhabditis Elegans* Embryos." *Development* 124(19):3815–26. doi: 10.1242/dev.124.19.3815.
- Boxem, M., and S. van den Heuvel. 2001. "Lin-35 Rb and Cki-1 Cip/Kip Cooperate in Developmental Regulation of G1 Progression in *C. Elegans*." *Development (Cambridge, England)* 128(21):4349–59. doi: 10.1242/dev.128.21.4349.
- Brauchle, Michael, Karine Baumer, and Pierre Gönczy. 2003. "Differential Activation of the DNA Replication Checkpoint Contributes to Asynchrony of Cell Division in *C. Elegans* Embryos." *Current Biology : CB* 13(10):819–27. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00295-1.
- Brenner, S. 1974. "The Genetics of *Caenorhabditis Elegans*." *Genetics* 77(1):71–94. doi: 10.1093/GENETICS/77.1.71.
- Bretscher, A. 1983. "Purification of an 80,000-Dalton Protein That Is a Component of the Isolated Microvillus Cytoskeleton, and Its Localization in Nonmuscle Cells." *Journal of Cell Biology* 97(2):425–32. doi: 10.1083/jcb.97.2.425.
- Bretscher, A., and K. Weber. 1978. "Localization of Actin and Microfilament-Associated Proteins in the Microvilli and Terminal Web of the Intestinal Brush Border by Immunofluorescence Microscopy." *Journal of Cell Biology* 79(3):839–45. doi: 10.1083/jcb.79.3.839.
- Bretscher, A., and K. Weber. 1980. "Fimbrin, a New Microfilament-Associated Protein Present in Microvilli and Other Cell Surface Structures." *Journal of Cell Biology* 86(1):335–40. doi: 10.1083/jcb.86.1.335.
- Broitman-Maduro, Gina, Morris F. Maduro, and Joel H. Rothman. 2005. "The Noncanonical Binding Site of the MED-1 GATA Factor Defines Differentially Regulated Target Genes in the *C. Elegans* Mesendoderm." *Developmental Cell* 8(3):427–33. doi: 10.1016/j.devcel.2005.01.014.
- Calvo, D., M. Victor, F. Gay, G. Sui, M. P. Luke, P. Dufourcq, G. Wen, M. Maduro, J. Rothman, and Y. Shi. 2001. "A POP-1 Repressor Complex Restricts Inappropriate Cell Type-Specific Gene Transcription during *Caenorhabditis Elegans* Embryogenesis." *The EMBO Journal* 20(24):7197–7208. doi: 10.1093/emboj/20.24.7197.
- Carberry, Katrin, Tobias Wiesenfahrt, Florian Geisler, Stephanie Stöcker, Harald Gerhardus, Daniel Überbach, Wayne Davis, Erik Jorgensen, Rudolf E. Leube, and Olaf Bossinger. 2012. "The Novel Intestinal Filament Organizer IFO-1 Contributes to Epithelial Integrity in Concert with ERM-1 and DLG-1." *Development* 139(10):1851–62. doi: 10.1242/dev.075788.
- Carberry, Katrin, Tobias Wiesenfahrt, Reinhard Windoffer, Olaf Bossinger, and Rudolf E. Leube. 2009. "Intermediate Filaments in *Caenorhabditis Elegans*." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 66(10):852–64. doi: 10.1002/cm.20372.
- Chartier, Nicolas T., Diana P. Salazar Ospina, Laura Benkemoun, Mirjam Mayer, Stephan W. Grill, Amy S. Maddox, and Jean Claude Labbé. 2011. "PAR-4/LKB1 Mobilizes Nonmuscle Myosin through Anillin to Regulate *C. Elegans* Embryonic Polarization and Cytokinesis." *Current Biology* 21(4):259–69. doi: 10.1016/j.cub.2011.01.010.

- Chen, Jia, Aram Christopher Sayadian, Nick Lowe, Holly E. Lovegrove, and Daniel St Johnston. 2018. "An Alternative Mode of Epithelial Polarity in the *Drosophila* Midgut." *PLoS Biology* 16(10). doi: 10.1371/journal.pbio.3000041.
- Chhabra, Ekta Seth, and Henry N. Higgs. 2007. "The Many Faces of Actin: Matching Assembly Factors with Cellular Structures." *Nature Cell Biology* 9(10):1110–21. doi: 10.1038/ncb1007-1110.
- Chien, Shih Chieh, Eva Maria Brinkmann, Jerome Teuliere, and Gian Garriga. 2013. "Caenorhabditis Elegans PIG-1/MELK Acts in a Conserved PAR-4/LKB1 Polarity Pathway to Promote Asymmetric Neuroblast Divisions." *Genetics* 193(3):897–909. doi: 10.1534/genetics.112.148106.
- Choi, Hailey, Gina Broitman-Maduro, and Morris F. Maduro. 2017. "Partially Compromised Specification Causes Stochastic Effects on Gut Development in *C. Elegans*." *Developmental Biology* 427(1):49–60. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.05.007.
- Clucas, Caroline, Juan Cabello, Ingo Büssing, Ralf Schnabel, and Iain L. Johnstone. 2002. "Oncogenic Potential of a *C. Elegans* Cdc25 Gene Is Demonstrated by a Gain-of-Function Allele." *The EMBO Journal* 21(4):665–74. doi: 10.1093/emboj/21.4.665.
- Coch, Richard, and Rudolf Leube. 2016. "Intermediate Filaments and Polarization in the Intestinal Epithelium." *Cells* 5(3):32. doi: 10.3390/cells5030032.
- Cohen, David, Patrick J. Brennwald, Enrique Rodriguez-Boulan, and Anne Müsch. 2004. "Mammalian PAR-1 Determines Epithelial Lumen Polarity by Organizing the Microtubule Cytoskeleton." *Journal of Cell Biology* 164(5):717–27. doi: 10.1083/jcb.200308104.
- Cordova-Burgos, Luigy, Falshruti B. Patel, and Martha C. Soto. 2021. "E-Cadherin/Hmr-1 Membrane Enrichment Is Polarized by Wave-Dependent Branched Actin." *Journal of Developmental Biology* 9(2). doi: 10.3390/jdb9020019.
- Costa, M., W. Raich, C. Agbunag, B. Leung, J. Hardin, and J. R. Priess. 1998. "A Putative Catenin-Cadherin System Mediates Morphogenesis of the *Caenorhabditis Elegans* Embryo." *The Journal of Cell Biology* 141(1):297–308. doi: 10.1083/jcb.141.1.297.
- Cote, Lauren E., and Jessica L. Feldman. 2022. "Won't You Be My Neighbor: How Epithelial Cells Connect Together to Build Global Tissue Polarity." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10. doi: 10.3389/fcell.2022.887107.
- Crawley, Scott W, Mark S. Mooseker, and Matthew J. Tyska. 2014. "Shaping the Intestinal Brush Border." *The Journal of Cell Biology* 207(4):441–51. doi: 10.1083/jcb.201407015.
- Crawley, Scott W., David A. Shifrin, Nathan E. Grega-Larson, Russell E. McConnell, Andrew E. Benesh, Suli Mao, Yuxi Zheng, Qing Yin Zheng, Ki Taek Nam, Bryan A. Millis, Bechara Kachar, and Matthew J. Tyska. 2014. "Intestinal Brush Border Assembly Driven by Protocadherin-Based Intermicrovillar Adhesion." *Cell* 157(2):433–46. doi: 10.1016/J.CELL.2014.01.067.
- Crittenden, S. L., D. Rudel, J. Binder, T. C. Evans, and J. Kimble. 1997. "Genes Required for GLP-1 Asymmetry in the Early *Caenorhabditis Elegans* Embryo." *Developmental Biology* 181(1):36–46. doi: 10.1006/dbio.1996.8413.
- Croce, Assunta, Giuseppe Cassata, Andrea Disanza, Maria Cristina Gagliani, Carlo Tacchetti, Maria Gracia Malabarba, Marie France Carlier, Giorgio Scita, Ralf Baumeister, and Pier Paolo di Fiore. 2004. "A Novel Actin Barbed-End-Capping Activity in EPS-8 Regulates Apical Morphogenesis in

- Intestinal Cells of *Caenorhabditis Elegans*." *Nature Cell Biology* 6(12):1173–79. doi: 10.1038/ncb1198.
- Delacour, Delphine, Julie Salomon, Sylvie Robine, and Daniel Louvard. 2016. "Plasticity of the Brush Border—the Yin and Yang of Intestinal Homeostasis." *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 13(3):161–74.
- Denning, Daniel P., Victoria Hatch, and H. Robert Horvitz. 2012. "Programmed Elimination of Cells by Caspase-Independent Cell Extrusion in *C. Elegans*." *Nature* 2012 488:7410 488(7410):226–30. doi: 10.1038/nature11240.
- Deppe, U., E. Schierenberg, T. Cole, C. Krieg, D. Schmitt, B. Yoder, and G. von Ehrenstein. 1978. "Cell Lineages of the Embryo of the Nematode *Caenorhabditis Elegans*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75(1):376–80. doi: 10.1073/pnas.75.1.376.
- Dewey, Evan B., Danielle T. Taylor, and Christopher A. Johnston. 2015. "Cell Fate Decision Making through Oriented Cell Division." *Journal of Developmental Biology* 3(4):129–57. doi: 10.3390/JDB3040129.
- Dineen, Aidan, Erin Osborne Nishimura, Barbara Goszczynski, Joel H. Rothman, and James D. McGhee. 2018. "Quantitating Transcription Factor Redundancy: The Relative Roles of the ELT-2 and ELT-7 GATA Factors in the *C. Elegans* Endoderm." *Developmental Biology* 435(2):150–61. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.12.023.
- Doerflinger, H el ene, Richard Benton, Joshua M. Shulman, and Daniel st. Johnston. 2003. "The Role of PAR-1 in Regulating the Polarised Microtubule Cytoskeleton in the *Drosophila* Follicular Epithelium." *Development* 130(17):3965–75.
- Dorfman, Julia, and Ian G. Macara. 2008. "STRADalpha Regulates LKB1 Localization by Blocking Access to Importin-Alpha, and by Association with Crm1 and Exportin-7." *Molecular Biology of the Cell* 19(4):1614–26. doi: 10.1091/MBC.E07-05-0454.
- Draetta, G., and J. Eckstein. 1997. "Cdc25 Protein Phosphatases in Cell Proliferation." *Biochimica et Biophysica Acta* 1332(2):M53-63. doi: 10.1016/s0304-419x(96)00049-2.
- Draper, Bruce W., Craig C. Mello, Bruce Bowerman, Jeff Hardin, and James R. Priess. 1996. "MEX-3 Is a KH Domain Protein That Regulates Blastomere Identity in Early *C. Elegans* Embryos." *Cell* 87(2):205–16. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81339-2.
- Du, Zhuo, Fei He, Zidong Yu, Bruce Bowerman, and Zhirong Bao. 2015. "E3 Ubiquitin Ligases Promote Progression of Differentiation during *C. Elegans* Embryogenesis." *Developmental Biology* 398(2):267–79. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.12.009.
- Du, Zhuo, Anthony Santella, Fei He, Michael Tiongson, and Zhirong Bao. 2014. "De Novo Inference of Systems-Level Mechanistic Models of Development from Live-Imaging-Based Phenotype Analysis." *Cell* 156(1–2):359–72. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.046.
- Edgar, L. G., and J. D. McGhee. 1988. "DNA Synthesis and the Control of Embryonic Gene Expression in *C. Elegans*." *Cell* 53(4):589–99. doi: 10.1016/0092-8674(88)90575-2.
- Edgar, Lois G., Stephen Carr, Hong Wang, and William B. Wood. 2001. "Zygotic Expression of the Caudal Homolog Pal-1 Is Required for Posterior Patterning in *Caenorhabditis Elegans* Embryogenesis." *Developmental Biology* 229(1):71–88. doi: 10.1006/dbio.2000.9977.

- Essers, Jeroen, Arjan F. Theil, Céline Baldeyron, Wiggert A. van Cappellen, Adriaan B. Houtsmuller, Roland Kanaar, and Wim Vermeulen. 2005. "Nuclear Dynamics of PCNA in DNA Replication and Repair." *Molecular and Cellular Biology* 25(21):9350–59. doi: 10.1128/MCB.25.21.9350-9359.2005.
- Fath, K. R., S. N. Mamajiwalla, and D. R. Burgess. 1993. "The Cytoskeleton in Development of Epithelial Cell Polarity." *Journal of Cell Science. Supplement* 17:65–73. doi: 10.1242/jcs.1993.supplement\_17.10.
- Feldman, Jessica L., and James R. Priess. 2012. "A Role for the Centrosome and PAR-3 in the Hand-off of MTOC Function during Epithelial Polarization." *Current Biology* 22(7):575–82. doi: 10.1016/j.cub.2012.02.044.
- Feng, Hui, Weiwei Zhong, George Punkosdy, Subin Gu, Liang Zhou, Erin K. Seabolt, and Edward T. Kipreos. 1999. "CUL-2 Is Required for the G1-to-S-Phase Transition and Mitotic Chromosome Condensation in *Caenorhabditis Elegans*." *Nature Cell Biology* 1(8):486–92. doi: 10.1038/70272.
- Firestein, Bonnie L., and Christopher Rongo. 2001. "DLG-1 Is a MAGUK Similar to SAP97 and Is Required for Adherens Junction Formation" edited by M. C. Beckerle. *Molecular Biology of the Cell* 12(11):3465–75. doi: 10.1091/mbc.12.11.3465.
- Fukushige, T., M. G. Hawkins, and J. D. McGhee. 1998. "The GATA-Factor *Elt-2* Is Essential for Formation of the *Caenorhabditis Elegans* Intestine." *Developmental Biology* 198(2):286–302.
- Fukushige, T., M. J. Hendzel, D. P. Bazett-Jones, and J. D. McGhee. 1999. "Direct Visualization of the *Elt-2* Gut-Specific GATA Factor Binding to a Target Promoter inside the Living *Caenorhabditis Elegans* Embryo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(21):11883–88. doi: 10.1073/pnas.96.21.11883.
- Fukushige, Tetsunari, Barbara Goszczynski, Jie Yan, and James D. McGhee. 2005. "Transcriptional Control and Patterning of the *Pho-1* Gene, an Essential Acid Phosphatase Expressed in the *C. Elegans* Intestine." *Developmental Biology* 279(2):446–61. doi: 10.1016/J.YDBIO.2004.12.012.
- Fukuyama, Masamitsu, Steven B. Gendreau, W. Brent Derry, and Joel H. Rothman. 2003. "Essential Embryonic Roles of the *CKI-1* Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor in Cell-Cycle Exit and Morphogenesis in *C. Elegans*." *Developmental Biology* 260(1):273–86. doi: 10.1016/S0012-1606(03)00239-2.
- van Fürden, Daniela, Kevin Johnson, Christoph Segbert, and Olaf Bossinger. 2004. "The *C. Elegans* Ezrin-Radixin-Moesin Protein *ERM-1* Is Necessary for Apical Junction Remodelling and Tubulogenesis in the Intestine." *Developmental Biology* 272(1):262–76. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.05.012.
- Gailite, Ieva, Birgit L. Aerne, and Nicolas Tapon. 2015. "Differential Control of Yorkie Activity by LKB1/AMPK and the Hippo/Warts Cascade in the Central Nervous System." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(37):E5169-78. doi: 10.1073/pnas.1505512112.
- Gally, Christelle, Frédéric Wissler, Hala Zahreddine, Sophie Quintin, Frédéric Landmann, and Michel Labouesse. 2009. "Myosin II Regulation during *C. Elegans* Embryonic Elongation: LET-502/ROCK, MRCK-1 and PAK-1, Three Kinases with Different Roles." *Development* 136(18):3109–19. doi: 10.1242/dev.039412.

- Gary, R., and A. Bretscher. 1995. "Ezrin Self-Association Involves Binding of an N-Terminal Domain to a Normally Masked C-Terminal Domain That Includes the F-Actin Binding Site." *Molecular Biology of the Cell* 6(8):1061–75. doi: 10.1091/mbc.6.8.1061.
- Geisler, Florian, Richard A. Coch, Christine Richardson, Martin Goldberg, Carlo Bevilacqua, Robert Prevedel, and Rudolf E. Leube. 2020. "Intestinal Intermediate Filament Polypeptides in *C. Elegans*: Common and Isoform-Specific Contributions to Intestinal Ultrastructure and Function." *Scientific Reports* 10(1):3142. doi: 10.1038/s41598-020-59791-w.
- Geisler, Florian, Richard A. Coch, Christine Richardson, Martin Goldberg, Bernd Denecke, Olaf Bossinger, and Rudolf E. Leube. 2019. "The Intestinal Intermediate Filament Network Responds to and Protects against Microbial Insults and Toxins." *Development (Cambridge)* 146(2). doi: 10.1242/dev.169482.
- Geisler, Florian, Harald Gerhardus, Katrin Carberry, Wayne Davis, Erik Jorgensen, Christine Richardson, Olaf Bossinger, and Rudolf E. Leube. 2016. "A Novel Function for the MAP Kinase SMA-5 in Intestinal Tube Stability." *Molecular Biology of the Cell* 27(24):3855–68. doi: 10.1091/mbc.E16-02-0099.
- Geisler, Florian, Sanne Remmelzwaal, Mike Boxem, Rudolf E. Leube, and Rudolf Leube. 2022. "Intermediate Filament Network Perturbation in the *C. Elegans* Intestine Causes Systemic Toxicity." *BioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2022.08.07.503108>.
- Gloerich, Martijn, Jean Paul ten Klooster, Marjolein J. Vliem, Thijs Koorman, Fried J. Zwartkruis, Hans Clevers, and Johannes L. Bos. 2012. "Rap2A Links Intestinal Cell Polarity to Brush Border Formation." *Nature Cell Biology* 14(8):793–801. doi: 10.1038/NCB2537.
- Göbel, Verena, Peter L. Barrett, David H. Hall, and John T. Fleming. 2004. "Lumen Morphogenesis in *C. Elegans* Requires the Membrane-Cytoskeleton Linker Erm-1." *Developmental Cell* 6(6):865–73. doi: 10.1016/j.devcel.2004.05.018.
- Goldstein, B. 1992. "Induction of Gut in *Caenorhabditis Elegans* Embryos." *Nature* 357(6375):255–57. doi: 10.1038/357255a0.
- Goldstein, B. 1993. "Establishment of Gut Fate in the E Lineage of *C. Elegans*: The Roles of Lineage-Dependent Mechanisms and Cell Interactions." *Development (Cambridge, England)* 118(4):1267–77. doi: 10.1242/dev.118.4.1267.
- Goldstein, B. 1995. "An Analysis of the Response to Gut Induction in the *C. Elegans* Embryo." *Development (Cambridge, England)* 121(4):1227–36. doi: 10.1242/dev.121.4.1227.
- Goldstein, Bob, and Ian G. Macara. 2007. "The PAR Proteins: Fundamental Players in Animal Cell Polarization." *Developmental Cell* 13(5):609–22. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2007.10.007.
- Goldstein, Bob, and Jeremy Nance. 2020. "*Caenorhabditis Elegans* Gastrulation: A Model for Understanding How Cells Polarize, Change Shape, and Journey toward the Center of an Embryo." *Genetics* 214(2):265–77. doi: 10.1534/genetics.119.300240.
- Goszczyński, Barbara, and James D. McGhee. 2005. "Reevaluation of the Role of the Med-1 and Med-2 Genes in Specifying the *Caenorhabditis Elegans* Endoderm." *Genetics* 171(2):545–55. doi: 10.1534/genetics.105.044909.

- Granger, Barbara, and Richard F. Baker. 1950. "Electron Microscope Investigation of the Striated Border of Intestinal Epithelium." *The Anatomical Record* 107(4):423–41. doi: 10.1002/ar.1091070409.
- Grimm-Günter, Eva-Maria S., Céline Revenu, Sonia Ramos, Ilse Hurbain, Neil Smyth, Evelyne Ferrary, Daniel Louvard, Sylvie Robine, and Francisco Rivero. 2009. "Plastin 1 Binds to Keratin and Is Required for Terminal Web Assembly in the Intestinal Epithelium." *Molecular Biology of the Cell* 20(10):2549–62. doi: 10.1091/mbc.e08-10-1030.
- Guo, Su, and Kenneth J. Kemphues. 1995. "Par-1, a Gene Required for Establishing Polarity in *C. Elegans* Embryos, Encodes a Putative Ser/Thr Kinase That Is Asymmetrically Distributed." *Cell* 81(4):611–20. doi: 10.1016/0092-8674(95)90082-9.
- Hawley, Simon A., Jérôme Boudeau, Jennifer L. Reid, Kirsty J. Mustard, Lina Udd, Tomi P. Mäkelä, Dario R. Alessi, and D. Grahame Hardie. 2003. "Complexes between the LKB1 Tumor Suppressor, STRAD Alpha/Beta and MO25 Alpha/Beta Are Upstream Kinases in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade." *Journal of Biology* 2(4):28. doi: 10.1186/1475-4924-2-28.
- Hebeisen, Michaël, and Richard Roy. 2008. "CDC-25.1 Stability Is Regulated by Distinct Domains to Restrict Cell Division during Embryogenesis in *C. Elegans*." *Development* 135(7):1259–69. doi: 10.1242/dev.014969.
- Hegan, Peter S., Hector Giral, Moshe Levi, and Mark S. Mooseker. 2012. "Myosin VI Is Required for Maintenance of Brush Border Structure, Composition, and Membrane Trafficking Functions in the Intestinal Epithelial Cell." *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 69(4):235–51. doi: 10.1002/CM.21018.
- Helander, Herbert F., and Lars Fändriks. 2014. "Surface Area of the Digestive Tract-Revisited." *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49(6):681–89. doi: 10.3109/00365521.2014.898326.
- Hemminki, Akseli, David Markie, Ian Tomlinson, Egle Avizienyte, Stina Roth, Anu Loukola, Graham Bignell, William Warren, Maria Aminoff, Pia Höglund, Heikki Järvinen, Paula Kristo, Katarina Pelin, Maaret Ridanpää, Reijo Salovaara, Tumi Toro, Walter Bodmer, Sylviane Olschwang, Anne S. Olsen, Michael R. Stratton, Albert de la Chapelle, and Lauri A. Aaltonen. 1998. "A Serine/Threonine Kinase Gene Defective in Peutz–Jeghers Syndrome." *Nature* 391(6663):184–87. doi: 10.1038/34432.
- Hemminki, Akseli, Ian Tomlinson, David Markie, Heikki Järvinen, Pertti Sistonen, Anna Maria Björkqvist, Sakari Knuutila, Reijo Salovaara, Walter Bodmer, Darryl Shibata, Albert de La Chapelle, and Lauri A. Aaltonen. 1997. "Localization of a Susceptibility Locus for Peutz–Jeghers Syndrome to 19p Using Comparative Genomic Hybridization and Targeted Linkage Analysis." *Nature Genetics* 15(1):87–90. doi: 10.1038/NG0197-87.
- Henle Jakob. 1837. "Symbolae Ad Anatomiam Villorum Intestinalium, Imprimis Eorum Epithelii Et Vasorum Lactorum." Retrieved October 9, 2022 (<https://www.amazon.ca/-/fr/Jakob-Henle/dp/1276744188>).
- Hermann, G. J., B. Leung, and J. R. Priess. 2000. "Left-Right Asymmetry in *C. Elegans* Intestine Organogenesis Involves a LIN-12/Notch Signaling Pathway." *Development (Cambridge, England)* 127(16):3429–40. doi: 10.1242/dev.127.16.3429.

- Hertzog, Maud, Francesca Milanesi, Larnele Hazelwood, Andrea Disanza, Hongjun Liu, Emilie Perlade, Maria Grazia Malabarba, Sebastiano Pasqualato, Alessio Maiolica, Stefano Confalonieri, Christophe le Clainche, Nina Offenhauser, Jennifer Block, Klemens Rottner, Pier Paolo di Fiore, Marie France Carlier, Niels Volkmann, Dorit Hanein, and Giorgio Scita. 2010. "Molecular Basis for the Dual Function of Eps8 on Actin Dynamics: Bundling and Capping." *PLoS Biology* 8(6). doi: 10.1371/journal.pbio.1000387.
- Hirokawa, N., L. G. Tilney, K. Fujiwara, and J. E. Heuser. 1982. "Organization of Actin, Myosin, and Intermediate Filaments in the Brush Border of Intestinal Epithelial Cells." *Journal of Cell Biology* 94(2):425–43. doi: 10.1083/jcb.94.2.425.
- Hoffmann, Michael, Christoph Segbert, Gisela Helbig, and Olaf Bossinger. 2010. "Intestinal Tube Formation in *Caenorhabditis Elegans* Requires Vang-1 and Egl-15 Signaling." *Developmental Biology* 339(2):268–79. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.12.002.
- Hong, Y., R. Roy, and V. Ambros. 1998. "Developmental Regulation of a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Controls Postembryonic Cell Cycle Progression in *Caenorhabditis Elegans*." *Development (Cambridge, England)* 125(18):3585–97. doi: 10.1242/dev.125.18.3585.
- Hu, Yabing, Xuewen Hu, Dongchen Li, Zhenzhen Du, Kun Shi, Chenxia He, Ying Zhang, and Donglei Zhang. 2021. "The APC/CFZY-1/Cdc20 Complex Coordinates With OMA-1 to Regulate the Oocyte-to-Embryo Transition in *Caenorhabditis Elegans*." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. doi: 10.3389/fcell.2021.749654.
- Huang, Nancy N., Darcy E. Mootz, Albertha J. M. Walhout, Marc Vidal, and Craig P. Hunter. 2002. "MEX-3 Interacting Proteins Link Cell Polarity to Asymmetric Gene Expression in *Caenorhabditis Elegans*." *Development* 129(3):747–59. doi: 10.1242/DEV.129.3.747.
- Huang, Shuyi, Premnath Shetty, Scott M. Robertson, and Rueyling Lin. 2007. "Binary Cell Fate Specification during *C. Elegans* Embryogenesis Driven by Reiterated Reciprocal Asymmetry of TCF POP-1 and Its Coactivator  $\beta$ -Catenin SYS-1." *Development* 134(14):2685–95. doi: 10.1242/dev.008268.
- Hunter, Craig P., and Cynthia Kenyon. 1996. "Spatial and Temporal Controls Target Pal-1 Blastomere-Specification Activity to a Single Blastomere Lineage in *C. Elegans* Embryos." *Cell* 87(2):217–26. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81340-9.
- Hunt-Newbury, Rebecca, Ryan Viveiros, Robert Johnsen, Allan Mah, Dina Anastas, Lily Fang, Erin Halfnight, David Lee, John Lin, Adam Lorch, Sheldon McKay, H. Mark Okada, Jie Pan, Ana K. Schulz, Domena Tu, Kim Wong, Z. Zhao, Andrey Alexeyenko, Thomas Burglin, Eric Sonnhammer, Ralf Schnabel, Steven J. Jones, Marco A. Marra, David L. Baillie, and Donald G. Moerman. 2007. "High-Throughput in Vivo Analysis of Gene Expression in *Caenorhabditis Elegans*." *PLoS Biology* 5(9):1981–97. doi: 10.1371/journal.pbio.0050237.
- Hüsken, Katrin, Tobias Wiesenfahrt, Christian Abraham, Reinhard Windoffer, Olaf Bossinger, and Rudolf E. Leube. 2008. "Maintenance of the Intestinal Tube in *Caenorhabditis Elegans*: The Role of the Intermediate Filament Protein IFC-2." *Differentiation* 76(8):881–96. doi: 10.1111/j.1432-0436.2008.00264.x.
- Jansen, Marnix, Jean Paul ten Klooster, G. Johan Offerhaus, and Hans Clevers. 2009. "LKB1 and AMPK Family Signaling: The Intimate Link between Cell Polarity and Energy Metabolism." *Physiological Reviews* 89(3):777–98.

- Jenne, Dieter E., Heike Reomann, Jun-ichi Nezu, Waltraut Friedel, Steffan Löff., Reinhard Jeschke, Oliver Müller, Walter Back, and Michael Zimmer. 1998. "Peutz-Jeghers Syndrome Is Caused by Mutations in a Novel Serine Threoninekinase." *Nature Genetics* 18(1):38–43. doi: 10.1038/ng0198-38.
- Ji, Hongbin, Matthew R. Ramsey, D. Neil Hayes, Cheng Fan, Kate McNamara, Piotr Kozlowski, Chad Torrice, Michael C. Wu, Takeshi Shimamura, Samantha A. Perera, Mei-Chih Liang, Dongpo Cai, George N. Naumov, Lei Bao, Cristina M. Contreras, Danan Li, Liang Chen, Janakiraman Krishnamurthy, Jussi Koivunen, Lucian R. Chirieac, Robert F. Padera, Roderick T. Bronson, Neal I. Lindeman, David C. Christiani, Xihong Lin, Geoffrey I. Shapiro, Pasi A. Jänne, Bruce E. Johnson, Matthew Meyerson, David J. Kwiatkowski, Diego H. Castrillon, Nabeel Bardeesy, Norman E. Sharpless, and Kwok-Kin Wong. 2007. "LKB1 Modulates Lung Cancer Differentiation and Metastasis." *Nature* 448(7155):807–10. doi: 10.1038/nature06030.
- Jishage, Kou-ichi, Jun-ichi Nezu, Yosuke Kawase, Takamitsu Iwata, Miho Watanabe, Akio Miyoshi, Asuka Ose, Kiyoshi Habu, Takei Kake, Nobuo Kamada, Otoya Ueda, Michiko Kinoshita, Dieter E. Jenne, Miyuki Shimane, and Hiroshi Suzuki. 2002. "Role of Lkb1, the Causative Gene of Peutz–Jegher's Syndrome, in Embryogenesis and Polyposis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(13):8903–8. doi: 10.1073/pnas.122254599.
- Kao, Gautam, Simon Tuck, David Baillie, and Meera v. Sundaram. 2004. "C. Elegans SUR-6/PR55 Cooperates with LET-92/Protein Phosphatase 2A and Promotes Raf Activity Independently of Inhibitory Akt Phosphorylation Sites." *Development* 131(4):755–65. doi: 10.1242/DEV.00987.
- Karabinos, Anton, Jürgen Schünemann, and Klaus Weber. 2004. "Most Genes Encoding Cytoplasmic Intermediate Filament (IF) Proteins of the Nematode *Caenorhabditis Elegans* Are Required in Late Embryogenesis." *European Journal of Cell Biology* 83(9):457–68. doi: 10.1078/0171-9335-00407.
- Karuman, Philip, Or Gozani, Robert D. Odze, Xun Clare Zhou, Hong Zhu, Reuben Shaw, Tom P. Brien, Christopher D. Bozzuto, Danny Ooi, Lewis C. Cantley, and Junying Yuan. 2001. "The Peutz-Jegher Gene Product LKB1 Is a Mediator of P53-Dependent Cell Death." *Molecular Cell* 7(6):1307–19. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00258-1.
- Katajisto, Pekka, Kari Vahtomeri, Niklas Ekman, Eeva Ventelä, Ari Ristimäki, Nabeel Bardeesy, Robert Feil, Ronald A. DePinho, and Tomi P. Mäkelä. 2008. "LKB1 Signaling in Mesenchymal Cells Required for Suppression of Gastrointestinal Polyposis." *Nature Genetics* 40(4):455–59. doi: 10.1038/ng.98.
- Kemphues, Kenneth J., James R. Priess, Diane G. Morton, and Niansheng Cheng. 1988. "Identification of Genes Required for Cytoplasmic Localization in Early *C. Elegans* Embryos." *Cell* 52(3):311–20. doi: 10.1016/S0092-8674(88)80024-2.
- Kipreos, E. T., S. P. Gohel, and E. M. Hedgecock. 2000. "The *C. Elegans* F-Box/WD-Repeat Protein LIN-23 Functions to Limit Cell Division during Development." *Development (Cambridge, England)* 127(23):5071–82. doi: 10.1242/dev.127.23.5071.
- ten Klooster, Jean Paul, Marnix Jansen, Jin Yuan, Viola Oorschot, Harry Begthel, Valeria di Giacomo, Frédéric Colland, John de Koning, Madelon M. Maurice, Peter Hornbeck, and Hans Clevers. 2009. "Mst4 and Ezrin Induce Brush Borders Downstream of the Lkb1/Strad/Mo25 Polarization Complex." *Developmental Cell* 16(4):551–62. doi: 10.1016/j.devcel.2009.01.016.

- Köppen, M., J. S. Simske, P. A. Sims, B. L. Firestein, D. H. Hall, A. D. Radice, C. Rongo, and J. D. Hardin. 2001. "Cooperative Regulation of AJM-1 Controls Junctional Integrity in *Caenorhabditis Elegans* Epithelia." *Nature Cell Biology* 3(11):983–91. doi: 10.1038/ncb1101-983.
- Kormish, Jay D., Jeb Gaudet, and J. D. McGhee James D. 2010. "Development of the *C. Elegans* Digestive Tract." *Current Opinion in Genetics and Development* 20(4):346–54.
- Kostić, Ivana, and Richard Roy. 2002. "Organ-Specific Cell Division Abnormalities Caused by Mutation in a General Cell Cycle Regulator in *C. Elegans*." *Development (Cambridge, England)* 129(9):2155–65. doi: 10.1242/dev.129.9.2155.
- Krawchuk, Dayana, Shihadeh Anani, Nobuko Honma-Yamanaka, Samantha Polito, Marian Shafik, and Yojiro Yamanaka. 2015. "Loss of LKB1 Leads to Impaired Epithelial Integrity and Cell Extrusion in the Early Mouse Embryo." *Journal of Cell Science* 128(5):1011–22. doi: 10.1242/jcs.162156.
- Lee, J. H., H. Koh, M. Kim, J. Park, S. Y. Lee, S. Lee, and J. Chung. 2006. "JNK Pathway Mediates Apoptotic Cell Death Induced by Tumor Suppressor LKB1 in *Drosophila*." *Cell Death and Differentiation* 13(7):1110–22. doi: 10.1038/SJ.CDD.4401790.
- Lee, Jen Yi, Daniel J. Marston, Timothy Walston, Jeff Hardin, Ari Halberstadt, and Bob Goldstein. 2006. "Wnt/Frizzled Signaling Controls *C. Elegans* Gastrulation by Activating Actomyosin Contractility." *Current Biology* 16(20):1986–97. doi: 10.1016/j.cub.2006.08.090.
- Lee, Jun Hee, Hyongjong Koh, Myungjin Kim, Yongsung Kim, Soo Young Lee, Roger E. Karess, Sang Hee Lee, Minh Shong, Jin Man Kim, Jaeseob Kim, and Jongkyeong Chung. 2007. "Energy-Dependent Regulation of Cell Structure by AMP-Activated Protein Kinase." *Nature* 447(7147):1017–20. doi: 10.1038/NATURE05828.
- Lee, Yong Uk, Miseol Son, Jiyoung Kim, Yhong Hee Shim, and Ichiro Kawasaki. 2016. "CDC-25.2, a *C. Elegans* Ortholog of Cdc25, Is Essential for the Progression of Intestinal Divisions." *Cell Cycle* 15(5):654–66.
- Legouis, R., A. Gansmuller, S. Sookhareea, J. M. Boshier, D. L. Baillie, and M. Labouesse. 2000. "LET-413 Is a Basolateral Protein Required for the Assembly of Adherens Junctions in *Caenorhabditis Elegans*." *Nature Cell Biology* 2(7):415–22. doi: 10.1038/35017046.
- Leung, B., G. J. Hermann, and J. R. Priess. 1999. "Organogenesis of the *Caenorhabditis Elegans* Intestine." *Developmental Biology* 216(1):114–34. doi: 10.1006/dbio.1999.9471.
- Lin, C. S., W. Shen, Z. P. Chen, Y. H. Tu, and P. Matsudaira. 1994. "Identification of I-Plastin, a Human Fimbrin Isoform Expressed in Intestine and Kidney." *Molecular and Cellular Biology* 14(4):2457–67. doi: 10.1128/MCB.14.4.2457.
- Lin, R., R. J. Hill, and J. R. Priess. 1998. "POP-1 and Anterior-Posterior Fate Decisions in *C. Elegans* Embryos." *Cell* 92(2):229–39. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80917-4.
- Lin, R., S. Thompson, and J. R. Priess. 1995. "Pop-1 Encodes an HMG Box Protein Required for the Specification of a Mesoderm Precursor in Early *C. Elegans* Embryos." *Cell* 83(4):599–609. doi: 10.1016/0092-8674(95)90100-0.
- Lin, Rueyling. 2003. "A Gain-of-Function Mutation in Oma-1, a *C. Elegans* Gene Required for Oocyte Maturation, Results in Delayed Degradation of Maternal Proteins and Embryonic Lethality." *Developmental Biology* 258(1):226–39. doi: 10.1016/S0012-1606(03)00119-2.

- Lin-Marq, Nathalie, Christelle Borel, and Stylianos E. Antonarakis. 2005. "Peutz-Jeghers LKB1 Mutants Fail to Activate GSK-3beta, Preventing It from Inhibiting Wnt Signaling." *Molecular Genetics and Genomics* : MGG 273(2):184–96. doi: 10.1007/s00438-005-1124-y.
- Liro, Małgorzata J., Diane G. Morton, and Lesilee S. Rose. 2018. "The Kinases PIG-1 and PAR-1 Act in Redundant Pathways to Regulate Asymmetric Division in the EMS Blastomere of *C. Elegans*." *Developmental Biology* 444(1):9–19. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.08.016.
- Lizcano, Jose M., Olga Göransson, Rachel Toth, Maria Deak, Nick A. Morrice, Jérôme Boudeau, Simon A. Hawley, Lina Udd, Tomi P. Mäkelä, D. Grahame Hardie, and Dario R. Alessi. 2004. "LKB1 Is a Master Kinase That Activates 13 Kinases of the AMPK Subfamily, Including MARK/PAR-1." *EMBO Journal* 23(4):833–43. doi: 10.1038/sj.emboj.7600110.
- Lo, Bryan, Geraldine Strasser, Meredith Sagolla, Cary D. Austin, Melissa Junntila, and Ira Mellman. 2012. "Lkb1 Regulates Organogenesis and Early Oncogenesis along AMPK-Dependent and -Independent Pathways." *Journal of Cell Biology* 199(7):1117–30. doi: 10.1083/jcb.201208080.
- Macqueen, A. J., † J J Baggett, ‡ N Perumov, R. A. Bauer, T. Januszewski, L. Schriefer, and J. A. Waddle. 2005. "ACT-5 Is an Essential *Caenorhabditis Elegans* Actin Required for Intestinal Microvilli Formation □ D." *Molecular Biology of the Cell* 16:3247–59. doi: 10.1091/mbc.E04.
- Maduro, M. F., M. D. Meneghini, B. Bowerman, G. Broitman-Maduro, and J. H. Rothman. 2001. "Restriction of Mesendoderm to a Single Blastomere by the Combined Action of SKN-1 and a GSK-3beta Homolog Is Mediated by MED-1 and -2 in *C. Elegans*." *Molecular Cell* 7(3):475–85. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00195-2.
- Maduro, Morris F. 2010. "Cell Fate Specification in the *C. Elegans* Embryo." *Developmental Dynamics* 239(5):1315–29.
- Maduro, Morris F. 2017. "Gut Development in *C. Elegans*." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 66:3–11.
- Maduro, Morris F., Gina Broitman-Maduro, Hailey Choi, Francisco Carranza, Allison Chia Yi Wu, and Scott A. Rifkin. 2015. "MED GATA Factors Promote Robust Development of the *C. Elegans* Endoderm." *Developmental Biology* 404(1):66–79. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.04.025.
- Maduro, Morris F., Gina Broitman-Maduro, Isabella Mengarelli, and Joel H. Rothman. 2007. "Maternal Deployment of the Embryonic SKN-1 → MED-1,2 Cell Specification Pathway in *C. Elegans*." *Developmental Biology* 301(2):590–601. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.08.029.
- Maduro, Morris F., Russell J. Hill, Paul J. Heid, Erin D. Newman-Smith, Jiangwen Zhu, James R. Priess, and Joel H. Rothman. 2005. "Genetic Redundancy in Endoderm Specification within the Genus *Caenorhabditis*." *Developmental Biology* 284(2):509–22. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.05.016.
- Maduro, Morris F., Jodie J. Kasmir, Jiangwen Zhu, and Joel H. Rothman. 2005. "The Wnt Effector POP-1 and the PAL-1/Caudal Homeoprotein Collaborate with SKN-1 to Activate *C. Elegans* Endoderm Development." *Developmental Biology* 285(2):510–23. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.06.022.
- Maduro, Morris F., Rueyling Lin, and Joel H. Rothman. 2002. "Dynamics of a Developmental Switch: Recursive Intracellular and Intranuclear Redistribution of *Caenorhabditis Elegans* POP-1 Parallels Wnt-Inhibited Transcriptional Repression." *Developmental Biology* 248(1):128–42. doi: 10.1006/dbio.2002.0721.

- Makky, Khadijah, Jackie Tekiela, and Alan N. Mayer. 2007. "Target of Rapamycin (TOR) Signaling Controls Epithelial Morphogenesis in the Vertebrate Intestine." *Developmental Biology* 303(2):501–13. doi: 10.1016/J.YDBIO.2006.11.030.
- Marshall, Kathryn E., Amber J. Tomasini, Khadijah Makky, Suresh N. Kumar, and Alan N. Mayer. 2010. "Dynamic Lkb1-TORC1 Signaling as a Possible Mechanism for Regulating the Endoderm-Intestine Transition." *Developmental Dynamics* 239(11):3000–3012. doi: 10.1002/DVDY.22437.
- Martin, Sophie G., and Daniel St Johnston. 2003. "A Role for Drosophila LKB1 in Anterior-Posterior Axis Formation and Epithelial Polarity." *Nature* 421(6921):379–84. doi: 10.1038/nature01296.
- McGhee, James D. 2013. "The Caenorhabditis Elegans Intestine." *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology* 2(3):347–67. doi: 10.1002/wdev.93.
- McGhee, James D., Tetsunari Fukushige, Michael W. Krause, Stephanie E. Minnema, Barbara Goszczynski, Jeb Gaudet, Yuji Kohara, Olaf Bossinger, Yongjun Zhao, Jaswinder Khattra, Martin Hirst, Steven J. M. Jones, Marco A. Marra, Peter Ruzanov, Adam Warner, Richard Zapf, Donald G. Moerman, and John M. Kalb. 2009. "ELT-2 Is the Predominant Transcription Factor Controlling Differentiation and Function of the C. Elegans Intestine, from Embryo to Adult." *Developmental Biology* 327(2):551–65. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.11.034.
- McGhee, James D., Monica C. Sleumer, Mikhail Bilenky, Kim Wong, Sheldon J. McKay, Barbara Goszczynski, Helen Tian, Natisha D. Krich, Jaswinder Khattra, Robert A. Holt, David L. Baillie, Yuji Kohara, Marco A. Marra, Steven J. M. Jones, Donald G. Moerman, and A. Gordon Robertson. 2007. "The ELT-2 GATA-Factor and the Global Regulation of Transcription in the C. Elegans Intestine." *Developmental Biology* 302(2):627–45. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.10.024.
- McMahon, L., R. Legouis, J. L. Vonesch, and M. Labouesse. 2001. "Assembly of C. Elegans Apical Junctions Involves Positioning and Compaction by LET-413 and Protein Aggregation by the MAGUK Protein DLG-1." *Journal of Cell Science* 114(Pt 12):2265–77. doi: 10.1242/jcs.114.12.2265.
- Mello, C. C., B. W. Draper, M. Krause, H. Weintraub, and J. R. Priess. 1992. "The Pie-1 and Mex-1 Genes and Maternal Control of Blastomere Identity in Early C. Elegans Embryos." *Cell* 70(1):163–76. doi: 10.1016/0092-8674(92)90542-k.
- Milburn, Christine C., Jérôme Boudeau, Maria Deak, Dario R. Alessi, and Daan M. F. van Aalten. 2004. "Crystal Structure of MO25 $\alpha$  in Complex with the C Terminus of the Pseudo Kinase STE20-Related Adaptor." *Nature Structural and Molecular Biology* 11(2):193–200. doi: 10.1038/nsmb716.
- Miyoshi, Hiroyuki, Masayuki Nakau, Tomo-o Ishikawa, Michael F. Seldin, Masanobu Oshima, and Makoto M. Taketo. 2002. "Gastrointestinal Hamartomatous Polyposis in Lkb1 Heterozygous Knockout Mice." *Cancer Research* 62(8):2261–66.
- Moll, Roland, Ralf Zimbelmann, Michaela D. Goldschmidt, Martina Keith, Jürgen Laufer, Michael Kasper, Peter J. Koch, and Werner W. Franke. 1993. "The Human Gene Encoding Cytokeratin 20 and Its Expression during Fetal Development and in Gastrointestinal Carcinomas." *Differentiation* 53(2):75–93. doi: 10.1111/j.1432-0436.1993.tb00648.x.

- Mooseker, M. S., T. D. Pollard, and K. A. Wharton. 1982. "Nucleated Polymerization of Actin from the Membrane-Associated Ends of Microvillar Filaments in the Intestinal Brush Border." *Journal of Cell Biology* 95(1):223–33. doi: 10.1083/jcb.95.1.223.
- Mooseker, M. S., and L. G. Tilney. 1975. "Organization of an Actin Filament-Membrane Complex. Filament Polarity and Membrane Attachment in the Microvilli of Intestinal Epithelial Cells." *Journal of Cell Biology* 67(3):725–43. doi: 10.1083/jcb.67.3.725.
- Mooseker, Mark S. 1985. "Organization, Chemistry, and Assembly of the Cytoskeletal Apparatus of the Intestinal Brush Border." *Annual Review of Cell Biology* 1(1):209–41. doi: 10.1146/annurev.cb.01.110185.001233.
- Morais-de-Sá, Eurico, Antonio Vega-Rioja, Vítor Trovisco, and Daniel StJohnston. 2013. "Oskar Is Targeted for Degradation by the Sequential Action of Par-1, GSK-3, and the SCF-Slimb Ubiquitin Ligase." *Developmental Cell* 26(3):303–14. doi: 10.1016/j.devcel.2013.06.011.
- Morton, D. G., J. M. Roos, and K. J. Kemphues. 1992. "Par-4, a Gene Required for Cytoplasmic Localization and Determination of Specific Cell Types in *Caenorhabditis Elegans* Embryogenesis." *Genetics* 130(4):771–90. doi: 10.1093/genetics/130.4.771.
- MUKHERJEE, T. M., and L. A. STAEHELIN. 1971. "The Fine-Structural Organization of the Brush Border of Intestinal Epithelial Cells." *Journal of Cell Science* 8(3):573–99. doi: 10.1242/jcs.8.3.573.
- Munn E.A., and Greenwood C.A. 1984. "The Occurrence of Submicrovillar Endotube (Modified Terminal Web) and Associated Cytoskeletal Structures in the Intestinal Epithelia of Nematodes." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 306(1125):1–18. doi: 10.1098/rstb.1984.0079.
- Nakamura, Kuniaki, Soyoung Kim, Takao Ishidate, Yanxia Bei, Kaming Pang, Masaki Shirayama, Chris Trzepacz, Daniel R. Brownell, and Craig C. Mello. 2005. "Wnt Signaling Drives WRM-1/ $\beta$ -Catenin Asymmetries in Early *C. Elegans* Embryos." *Genes & Development* 19(15):1749–54. doi: 10.1101/GAD.1323705.
- Nam, Sang Chul. 2016. "Role of Tau, a Microtubule Associated Protein, in *Drosophila* Photoreceptor Morphogenesis." *Genesis* 54(11):553–61. doi: 10.1002/dvg.22966.
- Narbonne, Patrick, Vincent Hyenne, Shaolin Li, Jean Claude Labbé, and Richard Roy. 2010. "Differential Requirements for STRAD in LKB1-Dependent Functions in *C. Elegans*." *Development* 137(4):661–70. doi: 10.1242/dev.042044.
- Neves, Alexandre, Kathryn English, and James R. Priess. 2007. "Notch-GATA Synergy Promotes Endoderm-Specific Expression of Ref-1 in *C. Elegans*." *Development* 134(24):4459–68. doi: 10.1242/dev.008680.
- Neves, Alexandre, and James R. Priess. 2005. "The REF-1 Family of BHLH Transcription Factors Pattern *C. Elegans* Embryos through Notch-Dependent and Notch-Independent Pathways." *Developmental Cell* 8(6):867–79. doi: 10.1016/j.devcel.2005.03.012.
- Nishi, Yuichi, and Rueyling Lin. 2005. "DYRK2 and GSK-3 Phosphorylate and Promote the Timely Degradation of OMA-1, a Key Regulator of the Oocyte-to-Embryo Transition in *C. Elegans*." *Developmental Biology* 288(1):139–49. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.09.053.

- Nishimura, Isao, Yufeng Yang, and Bingwei Lu. 2004. "PAR-1 Kinase Plays an Initiator Role in a Temporally Ordered Phosphorylation Process That Confers Tau Toxicity in *Drosophila*." *Cell* 116(5):671–82. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00170-9.
- Ohta, Keisuke, Ryuhei Higashi, Akira Sawaguchi, and Kei ichiro Nakamura. 2012. "Helical Arrangement of Filaments in Microvillar Actin Bundles." *Journal of Structural Biology* 177(2):513–19. doi: 10.1016/j.jsb.2011.10.012.
- Ollila, Saara, Eva Domènech-Moreno, Kaisa Laajanen, Iris P. L. Wong, Sushil Tripathi, Nalle Pentinmikko, Yajing Gao, Yan Yan, Elina H. Niemelä, Timothy C. Wang, Benoit Viollet, Gustavo Leone, Pekka Katajisto, Kari Vaahtomeri, and Tomi P. Mäkelä. 2018. "Stromal Lkb1 Deficiency Leads to Gastrointestinal Tumorigenesis Involving the IL-11-JAK/STAT3 Pathway." *The Journal of Clinical Investigation* 128(1):402–14. doi: 10.1172/JCI93597.
- Ossipova, Olga, Nabeel Bardeesy, Ronald A. DePinho, and Jeremy B. A. Green. 2003. "LKB1 (XEEK1) Regulates Wnt Signalling in Vertebrate Development." *Nature Cell Biology* 2003 5:10 5(10):889–94. doi: 10.1038/ncb1048.
- Owraghi, Melissa, Gina Broitman-Maduro, Thomas Luu, Heather Roberson, and Morris F. Maduro. 2010. "Roles of the Wnt Effector POP-1/TCF in the *C. Elegans* Endomesoderm Specification Gene Network." *Developmental Biology* 340(2):209–21. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.09.042.
- Pacquelet, Anne, Perrine Uhart, Jean Pierre Tassan, and Grégoire Michaux. 2015. "PAR-4 and Anillin Regulate Myosin to Coordinate Spindle and Furrow Position during Asymmetric Division." *The Journal of Cell Biology* 210(7):1085–99. doi: 10.1083/JCB.201503006.
- Page, Barbara D., Scott J. Diede, Jennifer R. Tenlen, and Edwin L. Ferguson. 2007. "EEL-1, a Hect E3 Ubiquitin Ligase, Controls Asymmetry and Persistence of the SKN-1 Transcription Factor in the Early *C. Elegans* Embryo." *Development* 134(12):2303–14. doi: 10.1242/dev.02855.
- Phillips, Bryan T., Ambrose R. Kidd, Ryan King, Jeff Hardin, and Judith Kimble. 2007. "Reciprocal Asymmetry of SYS-1/Beta-Catenin and POP-1/TCF Controls Asymmetric Divisions in *Caenorhabditis Elegans*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(9):3231–36. doi: 10.1073/PNAS.0611507104.
- Phillips, Carolyn M., and Dustin L. Updike. 2022. "Germ Granules and Gene Regulation in the *Caenorhabditis Elegans* Germline." *Genetics* 220(3). doi: 10.1093/GENETICS/IYAB195.
- Pickett M., Sallee M., Naturale V., Akpinaroglu D., Lee J., Shen K., and Feldman J. 2021. "Separable Mechanisms Drive Local and Global Polarity Establishment in the *C. Elegans* Intestinal Epithelium." *BioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.11.01.466827>.
- Pickett, Melissa A., Victor F. Naturale, and Jessica L. Feldman. 2019. "A Polarizing Issue: Diversity in the Mechanisms Underlying Apico-Basolateral Polarization In Vivo." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 29(1). doi: 10.1146/annurev-cellbio-100818.
- Pinette, Julia A., Suli Mao, Bryan A. Millis, Evan S. Krystofiak, James J. Faust, and Matthew J. Tyska. 2019. "Brush Border Protocadherin CDHR2 Promotes the Elongation and Maximized Packing of Microvilli in Vivo." *Molecular Biology of the Cell* 30(1):108–18. doi: 10.1091/mbc.E18-09-0558.

- Pocock, Roger, Julie Ahringer, Michael Mitsch, Sara Maxwell, and Alison Woollard. 2004. "A Regulatory Network of T-Box Genes and the Even-Skippedhomologue Vab-7 Controls Patterning and Morphogenesis in *C. Elegans*." *Development* 131(10):2373–85. doi: 10.1242/DEV.01110.
- Poffenberger, M. C., A. Metcalfe-Roach, E. Aguilar, J. Chen, B. E. Hsu, A. H. Wong, R. M. Johnson, B. Flynn, B. Samborska, E. H. Ma, S. P. Gravel, L. Tonelli, L. Devorkin, P. Kim, A. Hall, S. Izreig, E. Loginicheva, N. Beauchemin, P. M. Siegel, M. N. Artyomov, J. J. Lum, G. Zogopoulos, J. Blagih, and R. G. Jones. 2018. "LKB1 Deficiency in T Cells Promotes the Development of Gastrointestinal Polyposis." *Science (New York, N.Y.)* 361(6400):406–11. doi: 10.1126/science.aan3975.
- Pollard, T. D., and M. S. Mooseker. 1981. "Direct Measurement of Actin Polymerization Rate Constants by Electron Microscopy of Actin Filaments Nucleated by Isolated Microvillus Cores." *Journal of Cell Biology* 88(3):654–59. doi: 10.1083/jcb.88.3.654.
- Pollard, Thomas D., and Gary G. Borisy. 2003. "Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments." *Cell* 112(4):453–65. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00120-X.
- Potten, C. S. 1998. "Stem Cells in Gastrointestinal Epithelium: Numbers, Characteristics and Death." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 353(1370):821–30. doi: 10.1098/rstb.1998.0246.
- Raj, Arjun, Scott A. Rifkin, Erik Andersen, and Alexander van Oudenaarden. 2010. "Variability in Gene Expression Underlies Incomplete Penetrance." *Nature* 463(7283):913–18. doi: 10.1038/nature08781.
- Ramalho, Joaõ J., Jorian J. Sepers, Ophélie Nicolle, Ruben Schmidt, Janine Cravo, Grégoire Michaux, and Mike Boxem. 2020. "C-Terminal Phosphorylation Modulates ERM-1 Localization and Dynamics to Control Cortical Actin Organization and Support Lumen Formation during *Caenorhabditis Elegans* Development." *Development (Cambridge)* 147(14). doi: 10.1242/dev.188011.
- Rommelzwaal, Sanne, Florian Geisler, Riccardo Stucchi, Suzanne van der Horst, Milena Pasolli, Jason R. Kroll, Olga D. Jarosinska, Anna Akhmanova, Christine A. Richardson, Maarten Altelaar, Rudolf E. Leube, João J. Ramalho, and Mike Boxem. 2021. "BBLN-1 Is Essential for Intermediate Filament Organization and Apical Membrane Morphology." *Current Biology* 31(11):2334–2346.e9. doi: 10.1016/j.cub.2021.03.069.
- Rivers, David M., Sergio Moreno, Mary Abraham, and Julie Ahringer. 2008. "PAR Proteins Direct Asymmetry of the Cell Cycle Regulators Polo-like Kinase and Cdc25." *Journal of Cell Biology* 180(5):877–85. doi: 10.1083/jcb.200710018.
- Robertson, Scott M., Jessica Medina, and Rueyling Lin. 2014. "Uncoupling Different Characteristics of the *C. Elegans* E Lineage from Differentiation of Intestinal Markers." *PLoS ONE* 9(9). doi: 10.1371/journal.pone.0106309.
- Rocheleau, C. E., W. D. Downs, R. Lin, C. Wittmann, Y. Bei, Y. H. Cha, M. Ali, J. R. Priess, and C. C. Mello. 1997. "Wnt Signaling and an APC-Related Gene Specify Endoderm in Early *C. Elegans* Embryos." *Cell* 90(4):707–16. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80531-0.
- Rodriguez-Boulan, Enrique, and Ian G. Macara. 2014. "Organization and Execution of the Epithelial Polarity Programme." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(4):225–42.

- Rossi, Derrick J., Antti Ylikorkala, Nina Korsisaari, Reijo Salovaara, Keijo Luukko, Virpi Launonen, Mark Henkemeyer, Ari Ristimäki, Lauri A. Aaltonen, and Tomi P. Mäkelä. 2002. "Induction of Cyclooxygenase-2 in a Mouse Model of Peutz-Jeghers Polyposis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(19):12327–32. doi: 10.1073/PNAS.192301399.
- Rowan, A., M. Churchman, R. Jefferey, A. Hanby, R. Poulson, and I. Tomlinson. 2000. "In Situ Analysis of LKB1/STK11 MRNA Expression in Human Normal Tissues and Tumours." *The Journal of Pathology* 192(2):203–6. doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<:AID-PATH686>3.0.CO;2-J.
- Roy, Vincent, Olivier Gagné, Karim Hamiche, Jean-Claude Labbé, and Patrick Narbonne. 2018. "Expression Pattern of Endogenous PAR-4A & C after CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing." *MicroPublication Biology* 2018(14). doi: 10.17912/micropub.biology.000075.
- Salas, Pedro J. I. 1999. "Insoluble  $\gamma$ -Tubulin-Containing Structures Are Anchored to the Apical Network of Intermediate Filaments in Polarized Caco-2 Epithelial Cells." *Journal of Cell Biology* 146(3):645–58. doi: 10.1083/jcb.146.3.645.
- Salas, Pedro J. I., Marcelo L. Rodriguez, Ana L. Viciano, Dora E. Vega-Salas, and Hans-Peter Hauri. 1997. "The Apical Submembrane Cytoskeleton Participates in the Organization of the Apical Pole in Epithelial Cells." *Journal of Cell Biology* 137(2):359–75. doi: 10.1083/jcb.137.2.359.
- Sallee, Maria D., Jennifer C. Zonka, Taylor D. Skokan, Brian C. Raftrey, and Jessica L. Feldman. 2018. "Tissue-Specific Degradation of Essential Centrosome Components Reveals Distinct Microtubule Populations at Microtubule Organizing Centers." *PLoS Biology* 16(8). doi: 10.1371/journal.pbio.2005189.
- Sallee, Maria Danielle, Melissa A. Pickett, and Jessica L. Feldman. 2021. "Apical Par Complex Proteins Protect against Programmed Epithelial Assaults to Create a Continuous and Functional Intestinal Lumen." *ELife* 10. doi: 10.7554/eLife.64437.
- Sanchez, Ariana D., Tess C. Branon, Lauren E. Cote, Alexandros Papagiannakis, Xing Liang, Melissa A. Pickett, Kang Shen, Christine Jacobs-Wagner, Alice Y. Ting, and Jessica L. Feldman. 2021. "Proximity Labeling Reveals Non-Centrosomal Microtubule-Organizing Center Components Required for Microtubule Growth and Localization." *Current Biology* 31(16):3586-3600.e11. doi: 10.1016/j.cub.2021.06.021.
- Sanchez-Cespedes, M. 2007. "A Role for LKB1 Gene in Human Cancer beyond the Peutz-Jeghers Syndrome." *Oncogene* 26(57):7825–32. doi: 10.1038/sj.onc.1210594.
- Saotome, Ichiko, Marcello Curto, and Andrea I. McClatchey. 2004. "Ezrin Is Essential for Epithelial Organization and Villus Morphogenesis in the Developing Intestine." *Developmental Cell* 6(6):855–64. doi: 10.1016/j.devcel.2004.05.007.
- Sapkota, Gopal P., Agnieszka Kieloch, Jose M. Lizcano, Sonia Lain, J. Simon C. Arthur, Michayla R. Williams, Nick Morrice, Maria Deak, and Dario R. Alessi. 2001. "Phosphorylation of the Protein Kinase Mutated in Peutz-Jeghers Cancer Syndrome, LKB1/STK11, at Ser431 by P90(RSK) and CAMP-Dependent Protein Kinase, but Not Its Farnesylation at Cys(433), Is Essential for LKB1 to Suppress Cell Vrowth." *The Journal of Biological Chemistry* 276(22):19469–82. doi: 10.1074/JBC.M009953200.

- Sardet, Christian, François Prodon, Gérard Prulière, and Janet Chenevert. 2004. "Polarisation Des Oeufs et Des Embryons : Principes Communs." 4. doi: 10.1051/medsci/2004204414.
- Saucedo, Leslie J., and Bruce A. Edgar. 2007. "Filling out the Hippo Pathway." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(8):613–21. doi: 10.1038/NRM2221.
- Sauer, Brian. 1998. "Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/Lox System." *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 14(4):381–92. doi: 10.1006/METH.1998.0593.
- Sauvanet, Cécile, Jessica Wayt, Thaher Pelaseyed, and Anthony Bretscher. 2015. "Structure, Regulation, and Functional Diversity of Microvilli on the Apical Domain of Epithelial Cells." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 31:593–621. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125234.
- Schlesinger, A., C. A. Shelton, J. N. Maloof, M. Meneghini, and B. Bowerman. 1999. "Wnt Pathway Components Orient a Mitotic Spindle in the Early Caenorhabditis Elegans Embryo without Requiring Gene Transcription in the Responding Cell." *Genes & Development* 13(15):2028–38. doi: 10.1101/gad.13.15.2028.
- Sebbagh, Michael, Marie Josée Santoni, Brian Hall, Jean Paul Borg, and Martin A. Schwartz. 2009. "Regulation of LKB1/STRAD Localization and Function by E-Cadherin." *Current Biology* 19(1):37–42. doi: 10.1016/j.cub.2008.11.033.
- Segbert, Christoph, Kevin Johnson, Carin Theres, Daniela van Fürden, and Olaf Bossinger. 2004. "Molecular and Functional Analysis of Apical Junction Formation in the Gut Epithelium of Caenorhabditis Elegans." *Developmental Biology* 266(1):17–26. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.10.019.
- Segref, Alexandra, Juan Cabello, Caroline Clucas, Ralf Schnabel, Iain L. Johnstone, and Marcos Gonzalez-Gaitan. 2010. "Fate Specification and Tissue-Specific Cell Cycle Control of the Caenorhabditis Elegans Intestine." *Molecular Biology of the Cell* 21:725–38. doi: 10.1091/mbc.E09.
- Sepers, Jorian J., João J. Ramalho, Jason R. Kroll, Ruben Schmidt, and Mike Boxem. 2022. "ERM-1 Phosphorylation and NRFL-1 Redundantly Control Lumen Formation in the C. Elegans Intestine." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10. doi: 10.3389/fcell.2022.769862.
- Seydoux, G., C. C. Mello, J. Pettitt, W. B. Wood, J. R. Priess, and A. Fire. 1996. "Repression of Gene Expression in the Embryonic Germ Lineage of C. Elegans." *Nature* 382(6593):713–16. doi: 10.1038/382713A0.
- Seydoux, Geraldine, and Andrew Fire. 1994. "Soma-Germline Asymmetry in the Distributions of Embryonic RNAs in Caenorhabditis Elegans." *Development (Cambridge, England)* 120(10):2823–34. doi: 10.1242/DEV.120.10.2823.
- Shackelford, David B., and Reuben J. Shaw. 2009. "The LKB1–AMPK Pathway: Metabolism and Growth Control in Tumour Suppression." *Nature Reviews Cancer* 9:8 9(8):563–75. doi: 10.1038/nrc2676.
- Shaw, Reuben J., Nabeel Bardeesy, Brendan D. Manning, Lyle Lopez, Monica Kosmatka, Ronald A. DePinho, and Lewis C. Cantley. 2004. "The LKB1 Tumor Suppressor Negatively Regulates MTOR Signaling." *Cancer Cell* 6(1):91–99. doi: 10.1016/j.ccr.2004.06.007.

- Shaye, Daniel D., and Martha C. Soto. 2021. "Epithelial Morphogenesis, Tubulogenesis and Forces in Organogenesis." Pp. 161–214 in *Current Topics in Developmental Biology*. Vol. 144. Academic Press Inc.
- Shelton, Christopher A., and Bruce Bowerman. 1996. "Time-Dependent Responses to Glp-1-Mediated Inductions in Early *C. Elegans* Embryos." *Development (Cambridge, England)* 122(7):2043–50. doi: 10.1242/DEV.122.7.2043.
- Shetty, Premnath, Miao Chia Lo, Scott M. Robertson, and Rueyling Lin. 2005. "C. Elegans TCF Protein, POP-1, Converts from Repressor to Activator as a Result of Wnt-Induced Lowering of Nuclear Levels." *Developmental Biology* 285(2):584–92. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.07.008.
- Shin, T. H., J. Yasuda, C. E. Rocheleau, R. Lin, M. Soto, Y. Bei, R. J. Davis, and C. C. Mello. 1999. "MOM-4, a MAP Kinase Kinase Kinase-Related Protein, Activates WRM-1/LIT-1 Kinase to Transduce Anterior/Posterior Polarity Signals in *C. Elegans*." *Molecular Cell* 4(2):275–80. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80375-5.
- Shirayama, Masaki, Martha C. Soto, Takao Ishidate, Soyoung Kim, Kuniaki Nakamura, Yanxia Bei, Sander van den Heuvel, and Craig C. Mello. 2006. "The Conserved Kinases CDK-1, GSK-3, KIN-19, and MBK-2 Promote OMA-1 Destruction to Regulate the Oocyte-to-Embryo Transition in *C. Elegans*." *Current Biology* 16(1):47–55. doi: 10.1016/j.cub.2005.11.070.
- Shorning, Boris Y., Joanna Zabkiewicz, Afshan McCarthy, Helen B. Pearson, Douglas J. Winton, Owen J. Sansom, Alan Ashworth, and Alan R. Clarke. 2009. "Lkb1 Deficiency Alters Goblet and Paneth Cell Differentiation in the Small Intestine." *PloS One* 4(1). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0004264.
- Sommermann, Erica M., Keith R. Strohmaier, Morris F. Maduro, and Joel H. Rothman. 2010. "Endoderm Development in *Caenorhabditis Elegans*: The Synergistic Action of ELT-2 and -7 Mediates the Specification → Differentiation Transition." *Developmental Biology* 347(1):154–66. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.08.020.
- Son, Miseol, Ichiro Kawasaki, Bong Kyeong Oh, and Yhong Hee Shim. 2016. "LIN-23, an E3 Ubiquitin Ligase Component, Is Required for the Repression of CDC-25.2 Activity during Intestinal Development in *Caenorhabditis Elegans*." *Molecules and Cells* 39(11):834–40. doi: 10.14348/molcells.2016.0238.
- Spicer, James, Sydonia Rayter, Neville Young, Richard Elliott, Alan Ashworth, and Darrin Smith. 2003. "Regulation of the Wnt Signalling Component PAR1 A by the Peutz-Jeghers Syndrome Kinase LKB1." *Oncogene* 22(30):4752–56. doi: 10.1038/sj.onc.1206669.
- Spilker, Annina C., Alexia Rabilotta, Caroline Zbinden, Jean Claude Labbé, and Monica Gotta. 2009. "MAP Kinase Signaling Antagonizes PAR-1 Function During Polarization of the Early *Caenorhabditis Elegans* Embryo." *Genetics* 183(3):965–77. doi: 10.1534/GENETICS.109.106716.
- Steinhart, Zachary, and Stephane Angers. 2018. "Wnt Signaling in Development and Tissue Homeostasis." *Development (Cambridge, England)* 145(11). doi: 10.1242/dev.146589.
- Stigler, Brandilyn, and Helen M. Chamberlin. 2012. "A Regulatory Network Modeled from Wild-Type Gene Expression Data Guides Functional Predictions in *Caenorhabditis Elegans* Development." *BMC Systems Biology* 6(1):77. doi: 10.1186/1752-0509-6-77.

- Strome, S., P. Martin, E. Schierenberg, and J. Paulsen. 1995. "Transformation of the Germ Line into Muscle in Mes-1 Mutant Embryos of *C. Elegans*." *Development (Cambridge, England)* 121(9):2961–72. doi: 10.1242/dev.121.9.2961.
- Sulston, J. E., E. Schierenberg, J. G. White, and J. N. Thomson. 1983. "The Embryonic Cell Lineage of the Nematode *Caenorhabditis Elegans*." *Developmental Biology* 100(1):64–119. doi: 10.1016/0012-1606(83)90201-4.
- Tadros, Wael, and Howard D. Lipshitz. 2009. "The Maternal-to-Zygotic Transition: A Play in Two Acts." *Development (Cambridge, England)* 136(18):3033–42. doi: 10.1242/DEV.033183.
- Tenenhaus, C., K. Subramaniam, M. A. Dunn, and G. Seydoux. 2001. "PIE-1 Is a Bifunctional Protein That Regulates Maternal and Zygotic Gene Expression in the Embryonic Germ Line of *Caenorhabditis Elegans*." *Genes and Development* 15(8):1031–40. doi: 10.1101/gad.876201.
- Tenlen, Jennifer R., Jeffrey N. Molk, Nitobe London, Barbara D. Page, and James R. Priess. 2008. "MEX-5 Asymmetry in One-Cell *C. Elegans* Embryos Requires PAR-4- and PAR-1-Dependent Phosphorylation." *Development* 135(22):3665–75. doi: 10.1242/dev.027060.
- Tenlen, Jennifer R., Jennifer A. Schisa, Scott J. Diede, and Barbara D. Page. 2006. "Reduced Dosage of Pos-1 Suppresses Mex Mutants and Reveals Complex Interactions among CCCH Zinc-Finger Proteins during *Caenorhabditis Elegans* Embryogenesis." *Genetics* 174(4):1933–45. doi: 10.1534/genetics.105.052621.
- Thorpe, C. J., A. Schlesinger, and B. Bowerman. 2000. "Wnt Signalling in *Caenorhabditis Elegans*: Regulating Repressors and Polarizing the Cytoskeleton." *Trends in Cell Biology* 10(1):10–17. doi: 10.1016/s0962-8924(99)01672-4.
- Thorpe, C. J., A. Schlesinger, J. C. Carter, and B. Bowerman. 1997. "Wnt Signaling Polarizes an Early *C. Elegans* Blastomere to Distinguish Endoderm from Mesoderm." *Cell* 90(4):695–705. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80530-9.
- Tiainen, M., A. Ylikorkala, and T. P. Mäkelä. 1999. "Growth Suppression by Lkb1 Is Mediated by a G(1) Cell Cycle Arrest." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(16):9248–51. doi: 10.1073/pnas.96.16.9248.
- Tiainen, Marianne, Kari Vaahtomeri, Antti Ylikorkala, and Tomi P. Mäkelä. 2002. "Growth Arrest by the LKB1 Tumor Suppressor: Induction of P21(WAF1/CIP1)." *Human Molecular Genetics* 11(13):1497–1504. doi: 10.1093/hmg/11.13.1497.
- Tilney, Lewis G., and Robert R. Cardell. 1970. "Factors Controlling the Reassembly of the Microvillous Border of the Small Intestine of the Salamander." *The Journal of Cell Biology* 47(2):408–22. doi: 10.1083/JCB.47.2.408.
- Tocchetti, Arianna, Charlotte Blanche Ekalle Soppo, Fabio Zani, Fabrizio Bianchi, Maria Cristina Gagliani, Benedetta Pozzi, Jan Rozman, Ralf Elvert, Nicole Ehrhardt, Birgit Rathkolb, Corinna Moerth, Marion Horsch, Helmut Fuchs, Valérie Gailus-Durner, Johannes Beckers, Martin Klingenspor, Eckhard Wolf, Martin Hrabé de Angelis, Eugenio Scanziani, Carlo Tacchetti, Giorgio Scita, Pier Paolo di Fiore, and Nina Offenhäuser. 2010. "Loss of the Actin Remodeler Eps8 Causes Intestinal Defects and Improved Metabolic Status in Mice." *PLoS ONE* 5(3). doi: 10.1371/journal.pone.0009468.

- Totong, Ronald, Annita Achilleos, and Jeremy Nance. 2007. "PAR-6 Is Required for Junction Formation but Not Apicobasal Polarization in *C. Elegans* Embryonic Epithelial Cells." *Development* 134(7):1259–68. doi: 10.1242/dev.02833.
- Tyska, Matthew J., Andrew T. Mackey, Jian-Dong Huang, Neil G. Copeland, Nancy A. Jenkins, and Mark S. Mooseker. 2005. "Myosin-1a Is Critical for Normal Brush Border Structure and Composition." *Molecular Biology of the Cell* 16:2443–57. doi: 10.1091/mbc.E04.
- Viswanatha, Raghuvir, Patrice Y. Ohouo, Marcus B. Smolka, and Anthony Bretscher. 2012. "Local Phosphocycling Mediated by LOK/SLK Restricts Ezrin Function to the Apical Aspect of Epithelial Cells." *Journal of Cell Biology* 199(6):969–84. doi: 10.1083/jcb.201207047.
- Vuong-Brender, Thanh T. K., Xinyi Yang, and Michel Labouesse. 2016. "C. Elegans Embryonic Morphogenesis." Pp. 597–616 in *Current Topics in Developmental Biology*. Vol. 116. Academic Press Inc.
- Waijers, Selma, João Jacob Ramalho, Thijs Koorman, Elisabeth Kruse, and Mike Boxem. 2015. "The *C. Elegans* Crumbs Family Contains a CRB3 Homolog and Is Not Essential for Viability." *Biology Open* 4(3):276–84. doi: 10.1242/bio.201410744.
- Waddington C.H. 1957. "The Strategy Of Genes." Retrieved October 4, 2022 (<https://archive.org/details/waddington-the-strategy-of-genes-1957>).
- Wang, Ji-Wu, Yuzuru Imai, and Bingwei Lu. 2007. "Activation of PAR-1 Kinase and Stimulation of Tau Phosphorylation by Diverse Signals Require the Tumor Suppressor Protein LKB1." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27(3):574–81. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5094-06.2007.
- Waring, D. A., and C. Kenyon. 1990. "Selective Silencing of Cell Communication Influences Anteroposterior Pattern Formation in *C. Elegans*." *Cell* 60(1):123–31. doi: 10.1016/0092-8674(90)90722-q.
- Waring, David A., and Cynthia Kenyon. 1991. "Regulation of Cellular Responsiveness to Inductive Signals in the Developing *C. Elegans* Nervous System." *Nature* 350(6320):712–15. doi: 10.1038/350712a0.
- Watts, J. L., D. G. Morton, J. Bestman, and K. J. Kemphues. 2000. "The *C. Elegans* Par-4 Gene Encodes a Putative Serine-Threonine Kinase Required for Establishing Embryonic Asymmetry." *Development* 127(7):1467–75. doi: 10.1242/dev.127.7.1467.
- Wei, Chongjuan, Christopher I. Amos, Nianxiang Zhang, Xiaopei Wang, Asif Rashid, Cheryl L. Walker, Richard R. Behringer, and Marsha L. Frazier. 2008. "Suppression of Peutz-Jeghers Polyposis by Targeting Mammalian Target of Rapamycin Signaling." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14(4):1167–71. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4007.
- Weller, R. O., and I. McColl. 1966. "Electron Microscope Appearances of Juvenile and Peutz-Jeghers Polyps." *Gut* 7(3):265–70. doi: 10.1136/gut.7.3.265.
- Wells, A. L., A. W. Lin, L. Q. Chen, D. Safer, S. M. Cain, T. Hasson, B. O. Carragher, R. A. Milligan, and H. L. Sweeney. 1999. "Myosin VI Is an Actin-Based Motor That Moves Backwards." *Nature* 401(6752):505–8. doi: 10.1038/46835.

- Whiteman, Eileen L., Shuling Fan, Jennifer L. Harder, Katherine D. Walton, Chia-Jen Liu, Abdul Soofi, Vanessa C. Fogg, Marc B. Hershenson, Gregory R. Dressler, Gail H. Deutsch, Deborah L. Gumucio, and Ben Margolis. 2014. "Crumbs3 Is Essential for Proper Epithelial Development and Viability." *Molecular and Cellular Biology* 34(1):43–56. doi: 10.1128/MCB.00999-13.
- Wiesenfahrt, Tobias, Janette Y. Berg, Erin Osborne Nishimura, Adam G. Robinson, Barbara Goszczynski, Jason D. Lieb, and James D. McGhee. 2016. "The Function and Regulation of the GATA Factor ELT-2 in the *C. Elegans* Endoderm." *Development (Cambridge)* 143(3):483–91. doi: 10.1242/dev.130914.
- Wilson, M. A., R. v Hoch, N. R. Ashcroft, M. E. Kosinski, and A. Golden. 1999. "A *Caenorhabditis Elegans* Wee1 Homolog Is Expressed in a Temporally and Spatially Restricted Pattern during Embryonic Development." *Biochimica et Biophysica Acta* 1445(1):99–109. doi: 10.1016/s0167-4781(99)00027-5.
- Xu, Xiaojian, Dan Jin, Joanne Durgan, and Alan Hall. 2013. "LKB1 Controls Human Bronchial Epithelial Morphogenesis through P114RhoGEF-Dependent RhoA Activation." *Molecular and Cellular Biology* 33(14):2671–82. doi: 10.1128/mcb.00154-13.
- Ylikorkala, A., D. J. Rossi, N. Korsisaari, K. Luukko, K. Alitalo, M. Henkemeyer, and T. P. Mäkelä. 2001. "Vascular Abnormalities and Dereglulation of VEGF in *Lkb1*-Deficient Mice." *Science (New York, N.Y.)* 293(5533):1323–26. doi: 10.1126/science.1062074.
- Yoo, Lina I., Daniel C. Chung, and Junying Yuan. 2002. "LKB1--a Master Tumour Suppressor of the Small Intestine and Beyond." *Nature Reviews. Cancer* 2(7):529–35. doi: 10.1038/nrc843.
- Zeng, Ping-Yao, and Shelley L. Berger. 2006. "LKB1 Is Recruited to the P21/WAF1 Promoter by P53 to Mediate Transcriptional Activation." *Cancer Research* 66(22):10701–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0999.
- Zeqiraj, Elton, Beatrice Maria Filippi, Maria Deak, Dario R. Alessi, and Daan M. F. van Aalten. 2009. "Structure of the LKB1-STRAD-MO25 Complex Reveals an Allosteric Mechanism of Kinase Activation." *Science (New York, N.Y.)* 326(5960):1707–11. doi: 10.1126/SCIENCE.1178377.
- Zhou, Xiaohui, Ramiro H. Massol, Fumihiko Nakamura, Xiang Chen, Benjamin E. Gewurz, Brigid M. Davis, Wayne Lencer, and Matthew K. Waldor. 2014. "Remodeling of the Intestinal Brush Border Underlies Adhesion and Virulence of an Enteric Pathogen." *MBio* 5(4). doi: 10.1128/mBio.01639-14.
- Zhu, Hao, Meijing Li, Ruixue Zhao, Ming Li, Yongping Chai, Zhiwen Zhu, Yihong Yang, Wei Li, Zhongyun Xie, Xiaomin Li, Kexin Lei, Xueming Li, and Guangshuo Ou. 2022. "In Situ Structure of Intestinal Apical Surface Reveals Nanobristles on Microvilli." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119(24):e2122249119. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.2122249119>.
- Zhu, J., T. Fukushige, J. D. McGhee, and J. H. Rothman. 1998. "Reprogramming of Early Embryonic Blastomeres into Endodermal Progenitors by a *Caenorhabditis Elegans* GATA Factor." *Genes & Development* 12(24):3809–14. doi: 10.1101/gad.12.24.3809.
- Zhu, J., R. J. Hill, P. J. Heid, M. Fukuyama, A. Sugimoto, J. R. Priess, and J. H. Rothman. 1997. "End-1 Encodes an Apparent GATA Factor That Specifies the Endoderm Precursor in *Caenorhabditis Elegans* Embryos." *Genes & Development* 11(21):2883–96. doi: 10.1101/gad.11.21.2883.

- Zilberman, Yuliya, Joshua Abrams, Dorian C. Anderson, and Jeremy Nance. 2017. "Cdc42 Regulates Junctional Actin but Not Cell Polarization in the *Caenorhabditis Elegans* Epider." *Journal of Cell Biology* 216(11):3729–44. doi: 10.1083/jcb.201611061.
- Zwaenepoela, Ingrid, Alexandra Nabaa, Marcel Menezes Lyra Da Cunhab, Laurence del Maestro, Etienne Formstecher, Daniel Louvard, and Monique Arpina. 2012. "Ezrin Regulates Microvillus Morphogenesis by Promoting Distinct Activities of Eps8 Proteins." *Molecular Biology of the Cell* 23(6):1080–94. doi: 10.1091/mbc.E11-07-0588.

**Titre :** Contrôle de l'hyperplasie intestinale par la kinase PAR-4/LKB1 chez *Caenorhabditis elegans*

**Mots clés :** *C. elegans*, intestin, PAR-4, spécification, hyperplasie, embryogénèse

**Résumé :** La protéine de polarité et suppresseur de tumeur PAR-4/LKB1 est considérée comme un régulateur majeur de la physiologie intestinale. Son activation ectopique est suffisante pour induire la formation de microvillosités apicales dans des lignées cellulaires intestinales cancéreuses, tandis que des mutations du gène *lkb1* sont responsables du syndrome de Peutz-Jeghers (PJS) dans lequel les patients développent des polypes intestinaux bénins. Il est crucial de mieux caractériser son rôle dans les entérocytes *in vivo*. Pour ce faire, nous avons utilisé la microscopie confocale et électronique pour observer l'épithélium intestinal chez les embryons *C. elegans* mutants *par-4*. De manière surprenante, PAR-4 n'est pas strictement requise pour la polarité intestinale

et la formation de microvillosités. Cependant, les embryons *par-4* présentent des entérocytes supplémentaires, ce qui entraîne des défauts dans l'architecture du tissu, notamment des déformations de la lumière. Des expériences de lignage ont révélé que le nombre excessif d'entérocytes présents dans les embryons *par-4* n'est pas induit par une hyperprolifération cellulaire, mais par des défauts de spécification. Alors que dans les embryons contrôles, les entérocytes proviennent tous du blastomère E, dans les embryons *par-4*, des entérocytes supplémentaires naissent également à partir du blastomère C. Ce travail révèle une nouvelle fonction nécessaire de PAR-4 pour restreindre l'acquisition du destin intestinal au lignage E.

**Title :** Control of intestinal hyperplasia by the kinase PAR-4/LKB1 in *Caenorhabditis elegans*

**Keywords :** *C. elegans*, intestine, PAR-4, specification, hyperplasia, embryogenesis

**Abstract :** The polarity and tumor suppressor protein PAR-4/LKB1 is thought to be a major regulator of intestinal physiology. Its ectopic activation is indeed sufficient to induce apical microvilli formation in intestinal cancer cell lines. Moreover, mutations in the *lkb1* gene are responsible for the Peutz-Jeghers syndrome (PJS) in which patients develop benign intestinal polyps. As this master kinase acts via various signaling pathways, it is crucial to better characterize its role in enterocytes *in vivo*. To do so, we used confocal and electron microscopy to observe the intestinal epithelium in *C. elegans par-4* mutant embryos. Surprisingly, PAR-4 is not strictly required for intestinal polarity and microvilli formation. However, *par-4* mutant embryos display extra enterocytes, which lead to

striking defects in tissue architecture, notably to strong lumen deformations. Lineage experiments revealed that PAR-4 does not control the number of enterocytes by regulating cell proliferation, but rather by controlling cell fate specification during embryogenesis. While in wild type embryos intestinal cells exclusively arise from the E blastomere, in *par-4* mutants additional enterocytes arise from the C blastomere. Thus, PAR-4 prevents intestinal specification in the C lineage of wild type embryos. This work reveals a novel function of PAR-4 in the regulation of cell fate specification during embryogenesis. This appears to be essential to prevent intestinal hyperplasia in *C. elegans*.