

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

**LE TRANSFERT BIDIRECTIONNEL D'UNE PETITE MOLÉCULE IMPERMÉABLE À LA
MEMBRANE ENTRE L'INTESTIN DE *C. ELEGANS* ET LA LIGNÉE GERMINALE**

MÉMOIRE PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
SARAH TURMEL-COUTURE

NOVEMBRE 2024

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

Pour Louiselle

REMERCIEMENTS

Je souhaite adresser mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire. Je remercie tout d'abord Dre Patrick Narbonne, mon directeur de recherche, pour le temps qu'il m'a consacré, son aide, ses conseils, mais aussi pour m'avoir offert une place à la maîtrise lorsque je suis entré dans son bureau après avoir essuyé mon premier refus en médecine.

Je tiens à remercier également mon collègue Pier-Olivier Martel de m'avoir transmis ses connaissances dans le domaine et pour la formation pratique qu'il m'a prodigué.

Je tiens aussi à remercier mes amis rencontrés dans les laboratoires du Pierre-Boucher, qui m'ont apporté du support, mais surtout, beaucoup de rire. Un immense merci à Lucie Beaulieu, qui a commencé ce projet, et qui est par la suite devenue mon pilier dans toutes les sphères de ma vie. Un grand merci également à Savanah Descôteaux, qui m'apportait au quotidien une grande écoute et un support inégalable, autant au niveau scientifique qu'au niveau émotionnel.

Finalement, je tiens à remercier ma mère, sans qui, bien des choses n'aurait pas pu être possible. Sa confiance infinie en mes capacités était parfois la seule chose qui m'a permis de continuer. Je suis énormément reconnaissante pour les valeurs qu'elle m'a transmises, pour son amour et surtout, sa présence.

RÉSUMÉ

La protéine kinase activée par le signal extracellulaire (ERK) est un régulateur positif de la prolifération cellulaire qui est souvent régulé à la hausse dans le cancer. Chez *C. elegans*, son orthologue MPK-1 stimule la prolifération des cellules souches germinales (CSG) de manière non autonome, à partir de l'intestin ou de la gonade somatique de l'animal. La manière dont MPK-1 s'acquitte de cette tâche à partir de l'un ou l'autre de ces deux tissus n'est cependant pas claire. Pourtant, des jonctions communicantes relient la gonade somatique à la lignée germinale, et celles-ci sont essentielles à la prolifération des cellules souches germinales. Nous avons donc pensé que l'activité somatique de la MPK-1 pourrait générer de petites molécules pro-prolifératives qui pourraient se diffuser de l'intestin et/ou de la gonade somatique vers la lignée germinale. Ici, à l'appui de cette hypothèse, nous démontrons qu'une fraction de la petite molécule fluorescente imperméable à la membrane, la 5-carboxyfluorescéine (5-CF), est transférée vers la lignée germinale après sa micro-injection dans l'intestin de l'animal. La plus grande partie de ce transfert nécessite le récepteur vitellin RME-2, mais une autre partie importante se produit indépendamment, par une voie inconnue. Nous montrons également que l'efficacité du transfert de l'intestin à la lignée germinale de cette fraction indépendante de RME-2 ne varie pas en fonction des taux de prolifération des CSG ou de l'activité MPK-1, ce qui indique que sa régulation n'est pas responsable de l'établissement des taux de prolifération des CSG. Enfin, nous montrons qu'à l'inverse, une fraction similaire de 5-CF injecté dans la lignée germinale est transférée dans l'intestin, démontrant la bidirectionnalité de cet échange. Dans l'ensemble, nos résultats établissent la possibilité d'un axe de signalisation spécifique entre l'intestin et la lignée germinale, médié par de petites molécules imperméables à la membrane, qui pourrait promouvoir la prolifération cellulaire des CSG de manière non autonome en aval de l'activité de la MPK-1, en passant d'un tissu à l'autre, notamment à travers des jonctions communicantes.

Mot clés : *Caenorhabditis elegans*, cellules souches, lignée germinale, jonctions communicantes, ERK/MAPK, signalisation cellulaire

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Stade du développement tumoral.	3
Figure 2. Les dix caractéristiques d'un cancer, selon Hallmarks of Cancer: The Next Generation	6
Figure 3. Niveaux de potentiel de différenciation des cellules souches.	10
Figure 4. Les destins possibles pour les cellules souches	13
Figure 5. Anatomie de <i>C. elegans</i>	15
Figure 6. Cycle de vie du nématode <i>C. elegans</i>	17
Figure 7. Développement de la lignée germinale.....	19
Figure 8. Mécanismes de régulation des cellules souches.....	22
Figure 9. Signalisation Ras chez <i>C. elegans</i> et les mammifères.....	28
Figure 10. Connexine, connexon et jonctions communicantes.....	30
Figure 11. Modèle des jonctions communicantes.....	32
Figure 12. Jonctions communicantes hétérométriques situées dans la gonade....	37
Figure 13. Endocytose des protéines vitellines par les ovocytes.	73

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

5-CF	5-CarboxyFluorescein
AAK	AMP-Associated Kinase
AMPK	AMP-activated protein kinase
APX	Anterior Pharynx in eXcess
<i>C.elegans</i>	Caenorhabditis Elegans
CSG	Cellule souche germinale
DAF	abnormal DAuer Formation
DTC	Distal Tip Cell
EGF	Epidermal Growth Factor
EGL	EGg Laying defective
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FOG	Feminization Of Germline
FOXO	Forkhead box O
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	Green Fluorescent Protein
GLP	abnormal Germ Line Proliferation
GRB	Growth Factor receptor bound protein
IGF	Insulin-like Growth Factor
IIS	insulin-like/IGF-1 signalling
INX	INneXin
JAK	JAnus Kinases
LAG	Lin-12 And Glp-1 phenotype
Let	LEThal

LIN	abnormal cell LINEage
LKB	serine/threonine kinase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MPK	MAP Kinase
PAR	abnormal embryonic PARTitioning of cytoplasm
PIK	phosphoinositide kinase
PTEN	Phosphatase and TENSin homolog
RME	Receptor Mediated Endocytosis
RTK	récepteur à activité tyrosine kinase
sap	Spliceosome-Associated Protein
sem	SEx Muscle abnormal
SH	Src homology
Sos	Son of Sevenless
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF	Transforming Growth Factor
TM	Transmembrane domain
TNF	Tumor Necrosis Factor
UNC	UNCoordinated

Table des matières

CHAPITRE I

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	iv
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	vi
INTRODUCTION	1
1.1 Cancer	1
1.1.1 Développement du cancer	1
1.1.2 Causes du cancer	4
1.1.3 Propriétés des cellules cancéreuses	5
1.1.4 Traitements.....	7
1.2 Les cellules souches	8
1.2.1 Biologie des cellules souches	11
1.2.2 Fonctionnement de la division.....	12
1.3 Modèle d'étude	13
1.3.1 Cycle de vie	16
1.3.2 Le développement de la lignée germinale.....	18
1.3.3 Régulation de l'avenir des cellules souches germinales	20
1.3.4 Régulation de la prolifération des cellules souches germinales	21
1.4 Voie de signalisation ERK/MAPK	25
1.5 Les jonctions communicantes	29
1.5.1 Cancer et jonctions communicantes.....	33
1.5.2 Implication des jonctions communicantes chez <i>C. elegans</i>	34
CHAPITRE II	38
2.1. Problématique et hypothèse de recherche	38
2.2. Article scientifique	40
Abstract.....	41
Introduction	42
Results.....	44
Discussion	49
Experimental procedures.....	52

Acknowledgements	54
Author contributions	54
Funding and additional information	55
Conflict of interest	55
References	55
Figure legends.....	61
Figures	64
CHAPITRE III	71
CONCLUSION.....	71
Bibliographie.....	81

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Cancer

1.1.1 Développement du cancer

Le cancer est le résultat d'une prolifération cellulaire anormale qui peut survenir dans tous les types de cellules du corps. Au cours du développement ainsi que tout au long de la vie adulte, de nombreux systèmes contrôlent l'équilibre du cycle de vie des cellules en réponse à des signaux de croissance, d'inhibition de croissance ou de mort cellulaire (Schafer 1998). Le cancer survient donc lorsque cet équilibre se rompt et provoque des divisions cellulaires excessives (Vermeulen, Van Bockstaele et al. 2003, Matthews, Bertoli et al. 2022). Il existe une grande variété de types de cancer qui peuvent tous varier dans leurs propriétés ainsi que dans leur réponse face à un traitement. Toutefois, les processus conduisant au développement du cancer sont assez similaires, peu importe le tissu d'origine ou le type de cancer.

On nomme tumeur n'importe quelle masse désorganisée de cellules, pouvant être soit bénigne ou maligne. Une tumeur bénigne demeure confinée à son tissu d'origine sans envahir les tissus avoisinants (Patel 2020, Boutry, Tissot et al. 2022). Les cellules d'une tumeur bénigne ressemblent à des cellules normales et peuvent même aussi fonctionner normalement. Leurs effets sont souvent négligeables jusqu'au moment où elles deviennent assez grosses pour obstruer ou comprimer des structures internes. Dans le cas de tissus sécrétoires, une tumeur peut également mener à une sursécrétion hormonale (Skoric, Korsic et al. 1999). Les tumeurs bénignes ont toutefois le potentiel de devenir malignes (Clark 1991). Une tumeur maligne aura la capacité d'envahir les tissus voisins en plus de se propager à travers tout le corps par les systèmes sanguins et/ou

lymphatiques, menant à l'apparition de métastase (Jang, Gardner et al. 2011). Les cellules qui composent ce genre de tumeur croissent et se divisent en général plus rapidement que les cellules normales (Patel 2020). La transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse implique généralement plusieurs étapes, chacune ajoutant des propriétés qui rendent les cellules plus susceptibles de devenir une tumeur maligne (Vogelstein and Kinzler 1993). Plusieurs années peuvent être nécessaires pour accumuler les multiples mutations et/ou changements épigénétiques requis pour former une tumeur cancéreuse (Martincorena and Campbell 2015), ce qui fait en sorte que; la plupart des cancers se développent généralement plus tardivement dans la vie d'un organisme(Aunan, Cho et al. 2017, Berben, Floris et al. 2021).

Au niveau cellulaire, le cancer commence lorsqu'une cellule se libère des contraintes normales de la division cellulaire et prolifère sans tenir compte des signaux environnants (Orgel 1963). L'initiation de la tumeur est souvent causée par une simple mutation dans une première cellule (Cooper GM 2000; (Quintana, Shackleton et al. 2008). Toutes les cellules produites par division de cette première cellule ancestrale et de sa descendance clonale présentent alors la même prolifération excessive. La progression tumorale se poursuit alors que des mutations supplémentaires se produisent dans les cellules de la population clonale pour générer de nouveau sous-clones de plus en plus prolifératifs. Les changements qui portent vers l'oncogenèse modifient plusieurs propriétés fondamentales des cellules, permettant à celles-ci d'échapper aux contrôles normaux de croissance et de résister à l'apoptose, lui conférant finalement le phénotype complet de cancer (American cancer society 2015; (Coghlin and Murray 2010) (Figure 1).

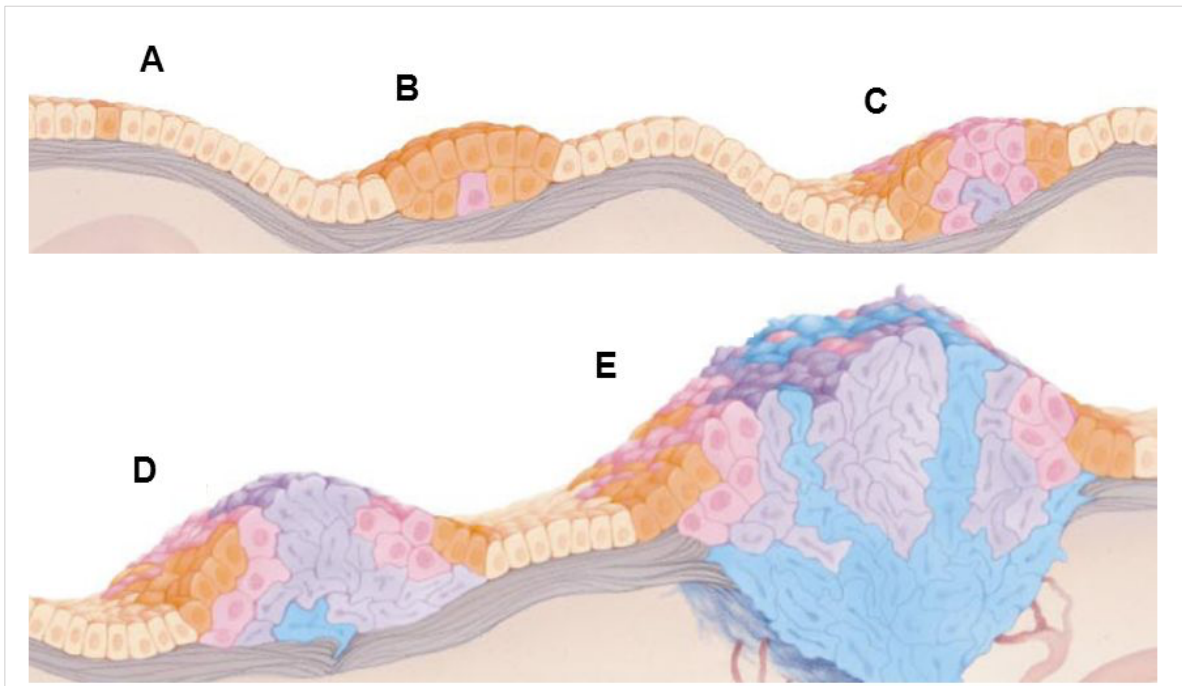


Figure 1. Stade du développement tumoral.

(A) Le développement tumoral débute lorsqu'une cellule (orange) à l'intérieur d'une population normale développe une mutation génétique. (B) La cellule altérée et ses descendantes se reproduisent rapidement. Après des années, une seconde mutation se produit (rose), amplifiant le phénomène de prolifération. (C) En plus de proliférer excessivement, la progéniture de cette cellule semble présenter une forme et une orientation anormale. Encore une fois, une autre mutation survient avec le temps (bleu). (D) Les cellules affectées deviennent encore plus anormales dans leur prolifération et leur apparence. La tumeur se contient in situ indéfiniment; certaines cellules peuvent à nouveau acquérir des mutations. (E) La tumeur maligne traverse les tissus, pouvant alors se propager et former des tumeurs secondaires à de nouveaux sites; un processus appelé métastase. (Weinberg 1996)

1.1.2 Causes du cancer

Le processus de formation du cancer est une interaction entre la génétique et l'environnement (Warburg 1956). La perte de régulation cellulaire responsable de la plupart des cas de cancer est due à des altérations génétiques et épigénétiques, elles-mêmes se produisant de façon spontanée, ou bien étant causées par une exposition prolongée à divers cancérigènes, comme des produits chimiques, des hormones et parfois des virus (Institute of Medicine (US) 2007). À la suite de mutations ou de changements épigénétiques, la plupart des cellules cancéreuses perdent un ou plusieurs systèmes de maintenance et réparation du génome, expliquant l'accumulation des nombreuses autres mutations qui s'en suivent (Amit, Citri et al. 2007, DeBerardinis, Lum et al. 2008). Les enzymes de réparation de l'ADN n'entravent pas directement la prolifération cellulaire, mais les cellules qui ont perdu la capacité de réparer les erreurs, les brèches ou les cassures dans l'ADN peuvent accumuler des mutations plus rapidement, et dans plusieurs gènes (Barnes and Lindahl 2004, Friedberg, Aguilera et al. 2006, Harper and Elledge 2007); notamment ceux qui sont essentiels pour le contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire (Ciccia and Elledge 2010). Ainsi, des mutations dans deux grandes catégories de gènes sont souvent impliquées dans l'oncogenèse : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs (Spandidos 2007, Kontomanolis, Koutras et al. 2020).

Les oncogènes sont les gènes qui favorisent la croissance normale des cellules (Cooper GM 2000; Perona 2006); des mutations peuvent les activer, ce qui favorise la croissance de manière excessive (Todd and Wong 1999). Ces mutations oncogéniques peuvent être causées, soit par des modifications ponctuelles qui conduisent à une forme hyperactive du proto-oncogène, par un événement d'amplification génique qui entraîne de nombreuses copies du proto-oncogène dans le génome et des niveaux d'expression plus élevés de ce gène, ou encore par une mutation dans la région promotrice du proto-oncogène qui conduit à une augmentation de son expression (Bell 1988). Ces mutations ont souvent un comportement dominant étant donné que l'altération d'un seul allèle

peut suffire pour conduire à une prolifération cellulaire incontrôlée(Viallet and Minna 1990).

Les gènes suppresseurs de tumeur sont ceux qui freinent normalement la prolifération cellulaire (Lane 1992, Lu, Luo et al. 2008, Joyce, Rayi et al. 2024). Les mutations qui les inactivent vont ainsi permettre des divisions cellulaires inappropriées (Jones and Thompson 2009). Ces mutations sont souvent qualifiées comme perte de fonction. Elles peuvent être causées par la suppression du gène suppresseur de tumeur, par une mutation ponctuelle qui conduit à une protéine fonctionnellement inactive, ou par une mutation qui perturbe la région promotrice, entraînant une perte ou une réduction de son expression. Puisqu'en général une copie du gène suppresseur de tumeur suffit pour contrôler la prolifération cellulaire, les deux allèles de ce gène doivent souvent être perdus ou inactivés pour favoriser la formation d'une tumeur, donnant un caractère génétiquement récessif à ce genre de mutation oncogénique(Bookstein and Allred 1993).

1.1.3 Propriétés des cellules cancéreuses

La croissance incontrôlée de la tumeur engendre une série d'anomalies qui affectent de nombreux mécanismes régulateurs chez les cellules. Pour devenir cancéreuses, les cellules doivent passer par une série de changement physiologique distinct (Hsu and Sabatini 2008). Elles vont souvent présenter des dysfonctions au niveau de la régulation de leur prolifération, de leur différenciation et de leur survie. Puisque leurs mécanismes de contrôle sont défectueux, les cellules cancéreuses vont continuer d'acquérir des mutations et éventuellement de développer des capacités invasives (Loeb and Loeb 2000). Ces différentes capacités acquises lors du développement du cancer et permettant la croissance tumorale ont été séparées en dix groupes distincts selon le chercheur Weinberg dans son article Hallmarks of Cancer: The Next Generation(Hanahan and Weinberg 2011) (Figure 2). Elles incluent l'autosuffisance en signaux de croissance, permettant aux cellules de se diviser sans dépendre de signaux externes, et l'insensibilité

aux signaux inhibiteurs de la croissance cellulaire. De plus, les cellules cancéreuses échappent à la mort cellulaire programmée et présentent une capacité de prolifération illimitée, souvent en maintenant leurs télomères. Elles favorisent également l'angiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour alimenter leur croissance. Enfin, elles peuvent envahir les tissus voisins et se propager à d'autres parties du corps. En complément, des traits supplémentaires comme l'inflammation, les modifications du métabolisme énergétique et l'évasion du système immunitaire soutiennent ces caractéristiques, offrant une meilleure compréhension du développement et de la progression du cancer, et ouvrant la voie à de nouvelles approches thérapeutiques(Hanahan and Weinberg 2011).

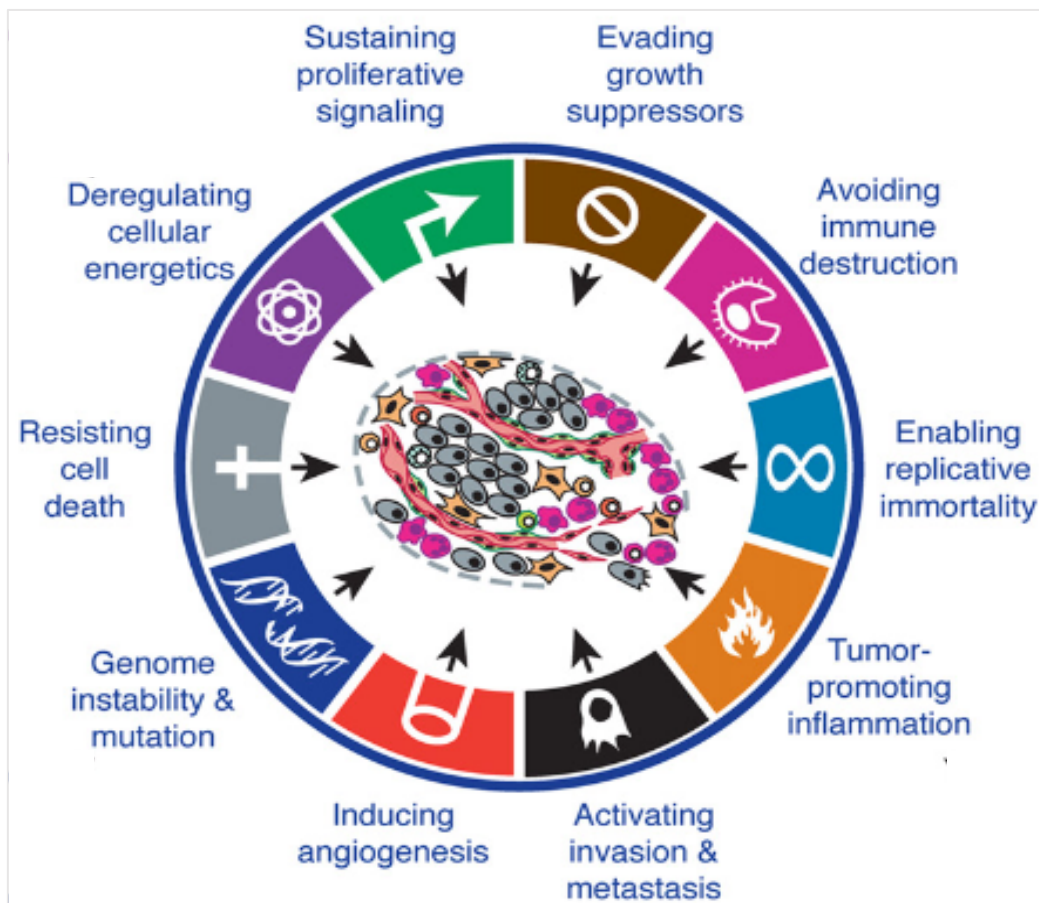


Figure 2. Les dix caractéristiques d'un cancer, selon Hallmarks of Cancer: The Next Generation (Hanahan and Weinberg 2011)

1.1.4 Traitements

Le cancer est une séquence très compliquée d'état pathologique progressant graduellement vers une perte généralisée du contrôle de la croissance. Les traitements les plus conventionnels proposés contre le cancer comprennent souvent un retrait chirurgical de la tumeur suivi par un traitement de radiothérapie ou de chimiothérapie. Toutefois, la chirurgie est souvent plus efficace dans un stade précoce du développement de la maladie. La radiothérapie consiste quant à elle à exposer le tissu cancéreux à un faisceau de rayonnement. Les radions causent la destruction des cellules cancéreuses en induisant des dommages à leurs ADN; mais vont également endommager les cellules et/ou les tissus sains, d'où l'importance de focaliser le faisceau sur la tumeur. La chimiothérapie va également endommager les cellules saines, et de façon systématique, surtout les cellules en division rapide. Le problème majeur rencontré avec les traitements de chimiothérapie est la chimiorésistance, qui se produit quand des cellules cancéreuses initialement supprimées par un médicament anticancéreux développent une résistance au médicament. Cela est le plus souvent dû à une réduction de l'absorption de médicaments et/ou à une augmentation de l'efflux de médicaments (Coley 2008, Chatterjee and Bivona 2019).

Un domaine d'intérêt clé dans la recherche pour le développement de nouveaux traitements contre le cancer réside dans l'exploitation des anomalies moléculaires des cellules cancéreuses pour provoquer leur destruction (Kroemer and Pouyssegur 2008, Stine, Schug et al. 2022). La thérapie médicamenteuse ciblée consiste en l'utilisation de drogues ou substances qui ont un effet sur une ou plusieurs caractéristiques nécessaires pour le développement du cancer (Figure 2). Les recherches sur le traitement du cancer sont donc axées sur la compréhension des systèmes de régulation cellulaire et sur les molécules qui y ont un rôle à jouer (McDonald and El-Deiry 2000, Ellis and Reardon 2009, Davies and Samuels 2010). Plusieurs protéines et cascades réactionnelles sont impliquées dans ces processus régulatoires. Certaines thérapies ciblées par exemple inhibent les enzymes qui favorisent la croissance des cellules cancéreuses. Ces médicaments sont

appelés inhibiteurs enzymatiques. Le blocage de ces signaux cellulaires peut ainsi empêcher le cancer de grossir et de se propager (Citri and Yarden 2006).

1.2 Les cellules souches

Dans de nombreux cas, la division cellulaire est décrite comme une cellule mère qui donne naissance à deux cellules filles qui lui ressemblent et se comportent exactement de la même manière qu'elle. Lorsque les propriétés de la descendance ne changent pas, on parle d'une division symétrique. Des différences peuvent toutefois survenir quand deux cellules sœurs, qui étaient identiques, divergent sous l'effet de différents effets développementaux ou environnementaux. Les cellules filles produites lors d'une division asymétrique diffèrent dès leur naissance, pouvant même aller jusqu'à hériter chacune d'une partie différente de la cellule mère. Les cellules filles ont alors une taille, une forme et/ou une composition différente. Leurs gènes peuvent également être dans différents états d'activation afin de leur assigner des destins distincts (Morrison and Kimble 2006).

Les cellules souches sont des cellules non spécialisées qui sont capables de se cloner par divisions symétriques en plus de pouvoir générer des types spécifiques de cellules plus spécialisées, soit à travers leur différenciation, soit à travers des divisions asymétriques. Elles jouent un rôle crucial durant le développement et la vie adulte des organismes (Morrison and Kimble 2006). Chez l'humain, il existe plusieurs étapes de différenciation durant le développement embryonnaire et, à chacune de celles-ci, le potentiel de différenciation des cellules souches diminue (Zakrzewski, Dobrzyński et al. 2019) (Figure 3).

Les cellules souches totipotentes sont capables de se diviser et de se différencier en toutes les cellules du corps ainsi que les cellules de soutien (*e.g.* placenta) qui sont nécessaires au développement embryonnaire (Cai, Chen et al. 2022). Elles ont le plus haut potentiel de différenciation (Zakrzewski, Dobrzyński et al. 2019). Un exemple de cellule

totipotente est le produit de la fertilisation d'un ovocyte par un spermatozoïde, le zygote. Après quelques divisions cellulaires supplémentaires, l'embryon forme le blastocyste (Condic 2014). À ce moment, la masse cellulaire interne du blastocyste se restreint et devient pluripotente.

Les cellules souches embryonnaires (ES) sont un exemple de cellules souches pluripotentes. Les cellules ES peuvent se différencier en tous les types cellulaires formant les trois feuillets embryonnaires primaires (endoderme, ectoderme et mésoderme) (Sukoyan, Vatolin et al. 1993, Larijani, Esfahani et al. 2012), mais pas en structures nécessaires à la formation d'un placenta. Un autre exemple de cellules souches pluripotentes est les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) (Zakrzewski, Dobrzyński et al. 2019). Les iPSC sont générées artificiellement à partir de cellules différenciées, qui sont reprogrammées pour devenir pluripotentes grâce à l'induction de facteurs de transcription normalement exprimés dans les cellules ES (Takahashi and Yamanaka 2006). La culture des iPSC et leur utilisation sont très prometteuses pour la médecine régénératrice actuelle et future (Biehl and Russell 2009).

Les cellules souches multipotentes ont la capacité de générer un certain nombre de différents types de cellules spécialisées, mais pas tous; c'est-à-dire que leur spectre de différenciation est plus étroit que celui des cellules pluripotentes. Par exemple, une cellule souche hématopoïétique, en plus de se reproduire elle-même, génère plusieurs types de cellules sanguines, mais jamais une cellule hépatique (Mosaad 2014). Les cellules souches multipotentes sont indifférenciées; en général, elles n'expriment pas les protéines caractéristiques de leurs descendants différenciés (Ratajczak, Zuba-Surma et al. 2012). Après différenciation, une cellule souche hématopoïétique devient une cellule unipotente.

Les cellules unipotentes peuvent continuer de proliférer mais ne peuvent se différencier qu'en quelques types cellulaires limités aux cellules leur lignée (Alison, Poulson et al. 2002). Une cellule progénitrice lymphoïde est un exemple qui peut se différencier en globules blancs, mais pas en globules rouges.

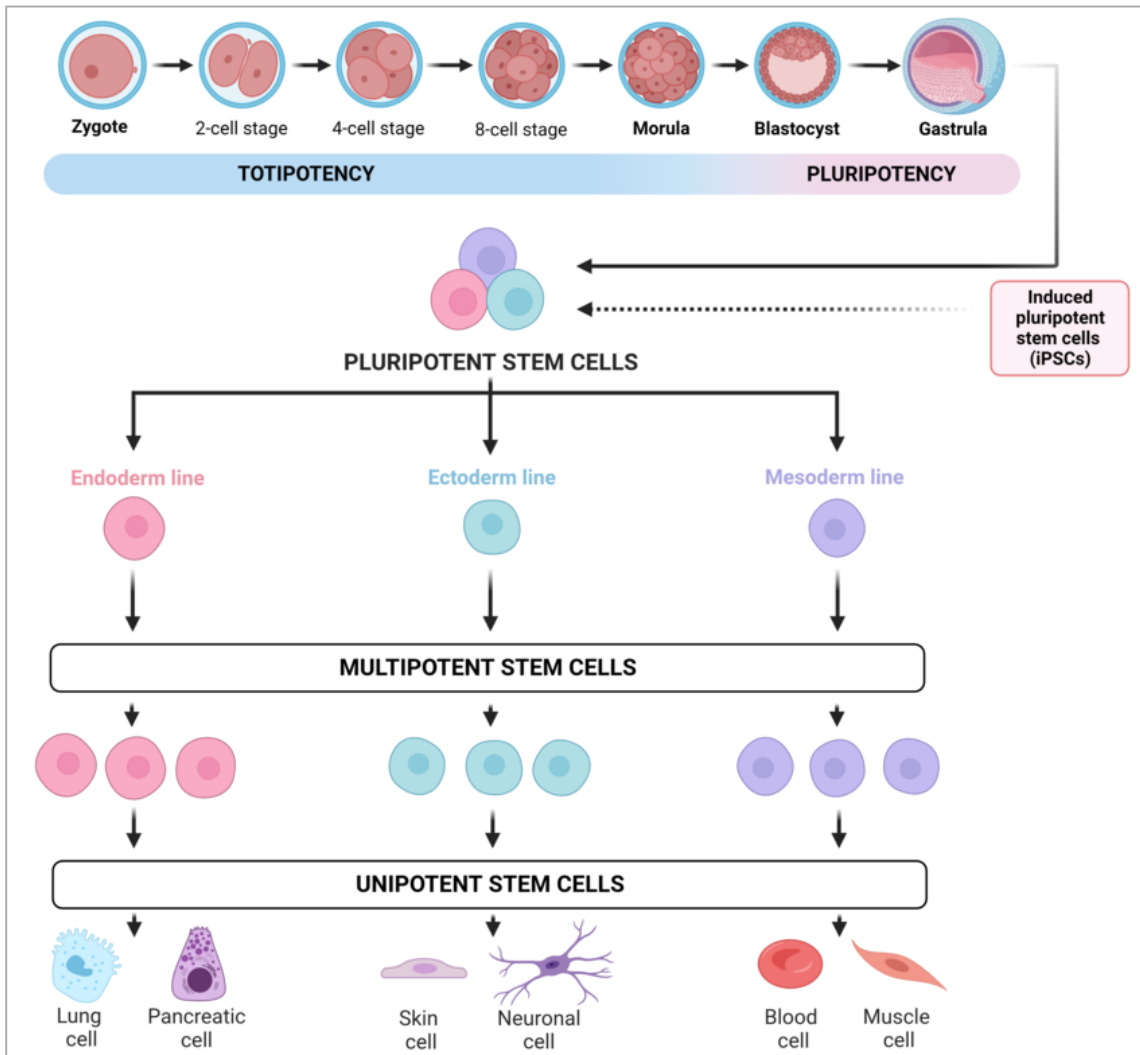


Figure 3. Niveaux de potentiel de différenciation des cellules souches.

Les cellules souches totipotentes peuvent se transformer en n'importe quel type de cellule, y compris celles nécessaires pour former un organisme entier et le placenta. Les cellules souches pluripotentes peuvent se spécialiser en cellules des trois couches germinales embryonnaires (ectoderme, endoderme, mésoderme). Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) sont génétiquement reprogrammées à partir de cellules adultes différenciées pour acquérir des propriétés similaires aux cellules souches pluripotentes. Les cellules souches multipotentes sont plus spécialisées et peuvent donner naissance à un nombre limité de types cellulaires liés dans des lignées spécifiques. Les cellules souches unipotentes ont une capacité de différenciation restreinte à un seul type de cellule mature spécifique à un tissu ou un organe (Ivkosic, Fures et al. 2023).

1.2.1 Biologie des cellules souches

Les cellules souches ont besoin d'un environnement particulier afin de garder leur état indifférencié. En plus de facteurs intrinsèques comme des protéines régulatrices, elles ont également besoin de facteurs extrinsèques, comme des hormones ou des signaux provenant des cellules environnantes (Morrison, Wright et al. 1997). L'environnement dans lequel les cellules souches peuvent survivre et fonctionner se nomme une niche (Schofield 1978). La niche cellulaire est un microenvironnement spécifique qui joue un rôle crucial dans le maintien, la régulation et la survie des cellules souches. Elle se réfère à un espace dans un tissu où des cellules souches résident et se développent, et elle est constituée de divers composants, notamment des cellules de soutien, de la matrice extracellulaire, des molécules d'adhésion, ainsi que des facteurs biochimiques intrinsèques et extrinsèques (Voog and Jones 2010, Singh 2012). Les contacts directs entre les cellules souches et celles des différentes composantes de leur niche crée un microenvironnement dynamique propice au maintien et à la régulation des cellules souches (Voog and Jones 2010).

Le concept de niche se manifeste différemment chez les organismes. Elle doit généralement maintenir une population adéquate de cellules souches, généralement en bloquant leur différenciation (Morrison and Spradling 2008). La taille et l'étendue de la signalisation d'une niche définissent ensemble un espace limité dans lequel les cellules souches peuvent exister (Li and Xie 2005). Chez la femelle drosophile, la cellule de la coiffe agit à titre de niche en activant la signalisation TGF-B dans les cellules souches germinale (Lin 2002, Yamashita, Fuller et al. 2005). Lorsqu'une cellule souche se divise, l'une des deux filles reste à proximité de la coiffe et est maintenue comme étant une cellule souche tandis que l'autre fille s'éloigne de la coiffe et entame le processus de différenciation (Sahai-Hernandez, Castanieto et al. 2012). La drosophile mâle utilise plutôt la signalisation JAK/STAT par l'entremise des cellules pivots qui composent la niche (Issigonis, Tulina et al. 2009).

Chez *C. elegans*, la niche, qui se compose d'une cellule à l'extrémité distale de chacun des bras des gonades, utilise la signalisation *Notch* pour maintenir une population de cellules souches germinales (Kimble and Crittenden 2007). Ici, la division est toutefois symétrique, et donne naissance à une population au sein de laquelle il y a une progression vers la différenciation au fur et à mesure que les cellules s'éloignent de la niche (Kimble and Crittenden 2007). L'orchestration de ces différents signaux est essentielle pour une bonne régulation du renouvellement des cellules souches ainsi que de l'engagement de la différenciation de la lignée germinale.

1.2.2 Fonctionnement de la division

Les signaux envoyés par la niche vont décider du destin qu'emprunteront les cellules souches. En se basant sur les deux caractéristiques des cellules souches, soit leur capacité à se cloner ou à se différencier, elles peuvent être décrites comme ayant quatre issues (Watt and Hogan 2000, Molofsky, Pardal et al. 2004, Biehl and Russell 2009) (Figure 4). Un premier destin possible est la quiescence de la cellule; elle maintient sa place dans la niche sans se diviser ou se différencier. Un deuxième destin des cellules souches est l'autorenouvellement symétrique. Les cellules filles qui résultent de la division sont exactement comme la cellule mère. On augmente ainsi la population de cellules à partir desquelles des cellules différenciées peuvent se développer lors de prochaines divisions. Le troisième destin survient lorsque deux cellules filles différentes sont générées. L'une est une copie de la cellule mère, tandis que l'autre est une cellule différenciée, donc plus spécialisée que la cellule mère. L'autorenouvellement asymétrique permet la génération d'une descendance différenciée nécessaire au développement et à la régénérescence des tissus, en plus de maintenir la population de cellules souches. Le dernier destin possible est lorsqu'une cellule souche se divise afin de former deux cellules filles différenciées. Cette division symétrique augmente la population de cellules différenciées tout en diminuant le bassin de cellules souches.

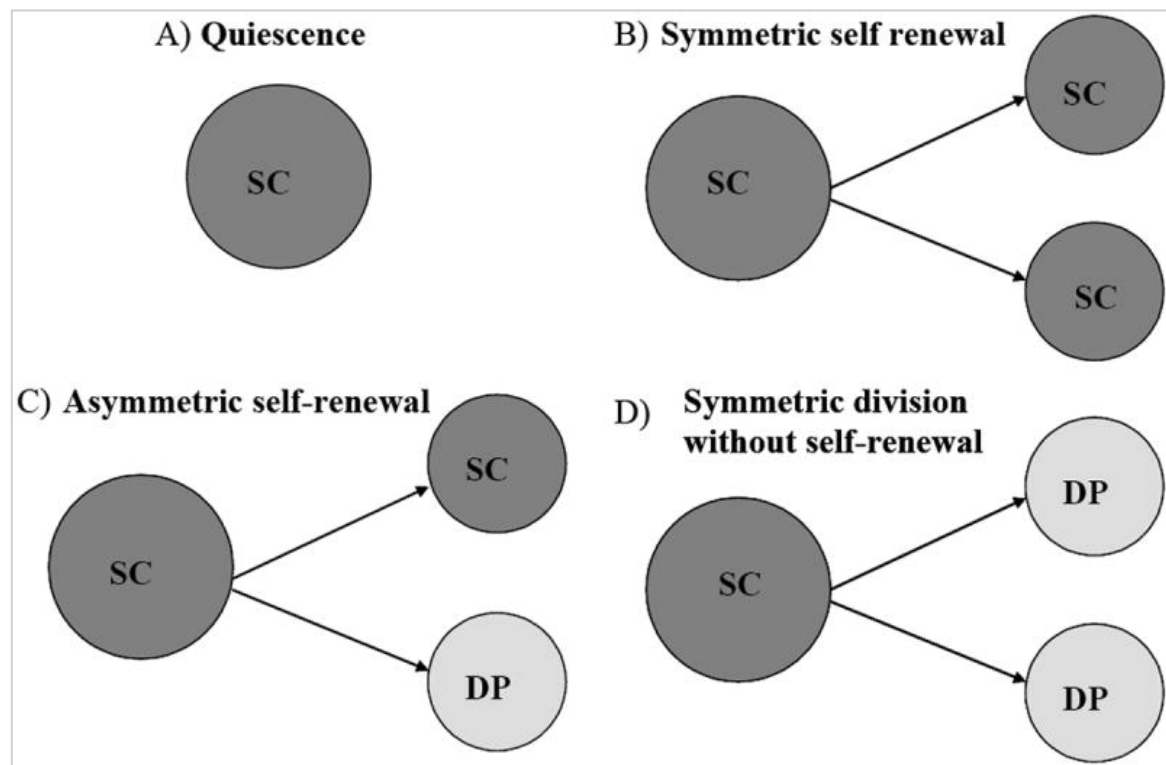


Figure 4. Les destins possibles pour les cellules souches
(Biehl and Russell 2009)

1.3 Modèle d'étude

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) est un nématode non pathogène, non segmenté et dont toutes les cellules sont transparentes et donc visibles au microscope dans les individus complets et vivants. La transparence de leur cuticule permet également l'étude des processus biologiques *in vivo* à l'aide de protéines fluorescentes (Burnell, Houthoofd et al. 2005). *C. elegans* est composé d'une cuticule et de cellules épidermales qui entourent l'intestin, la gonade, des cellules musculaires et environ 300 neurones (White, Southgate et al. 1986) (Figure 5). À l'âge adulte, le nématode compte 959 cellules somatiques et seules les cellules germinales continuent à se diviser (Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2009). *C. elegans* est largement utilisé comme modèle d'étude, car il comporte de nombreux avantages pour la recherche en biologie moléculaire et cellulaire, en biochimie

et en génétique (Corsi, Wightman et al. 2015). Le génome de *C. elegans* est complètement séquencé et son homologie démontre une forte conservation des mécanismes moléculaires et cellulaires avec l'humain (Lai, Chou et al. 2000). Au moins 38 % des gènes codant pour les protéines de *C. elegans* ont des orthologues prédit dans le génome humain (Shaye and Greenwald 2011), tandis que 60 à 80 % des gènes humains ont un orthologue dans le génome de *C. elegans* (Kaletta and Hengartner 2006). Puis, 40 % des gènes étants associés à des maladies humaines ont des orthologues clairs dans le génome de *C. elegans* (Culetto and Sattelle 2000).

Le nématode est également un modèle intéressant pour sa petite taille, sa facilité de culture, une facilité à éditer son génome par micro-injection et son cycle de vie rapide (Corsi, Wightman et al. 2015). La souche sauvage possède deux formes sexuelles; l'hermaphrodite (Figure 5a), qui s'autoféconde et le mâle (Figure 5b). L'importance des mâles repose sur l'échange de matériel génétique qui est souvent avantageux lors de périodes stressantes (Ward and Carrel 1979). Ils sont toutefois rares et la forme hermaphrodite est prédominante. Les hermaphrodites sont essentiellement des femelles qui produisent temporairement du sperme avant de produire des ovocytes (Corsi, Wightman et al. 2015). Lorsque l'hermaphrodite (XX) est croisé à un mâle (XO), le taux d'apparition de mâles est de 50%. Ainsi, il est facile de combiner des mutations homozygotes en accouplant les mâles $Y^{+/+}Z^{-/-}$ et un hermaphrodite $Y^{-/-}Z^{+/+}$ pour produire un hermaphrodite double mutant $Y^{-/-}Z^{-/-}$ qui s'automaintiendra par la suite.

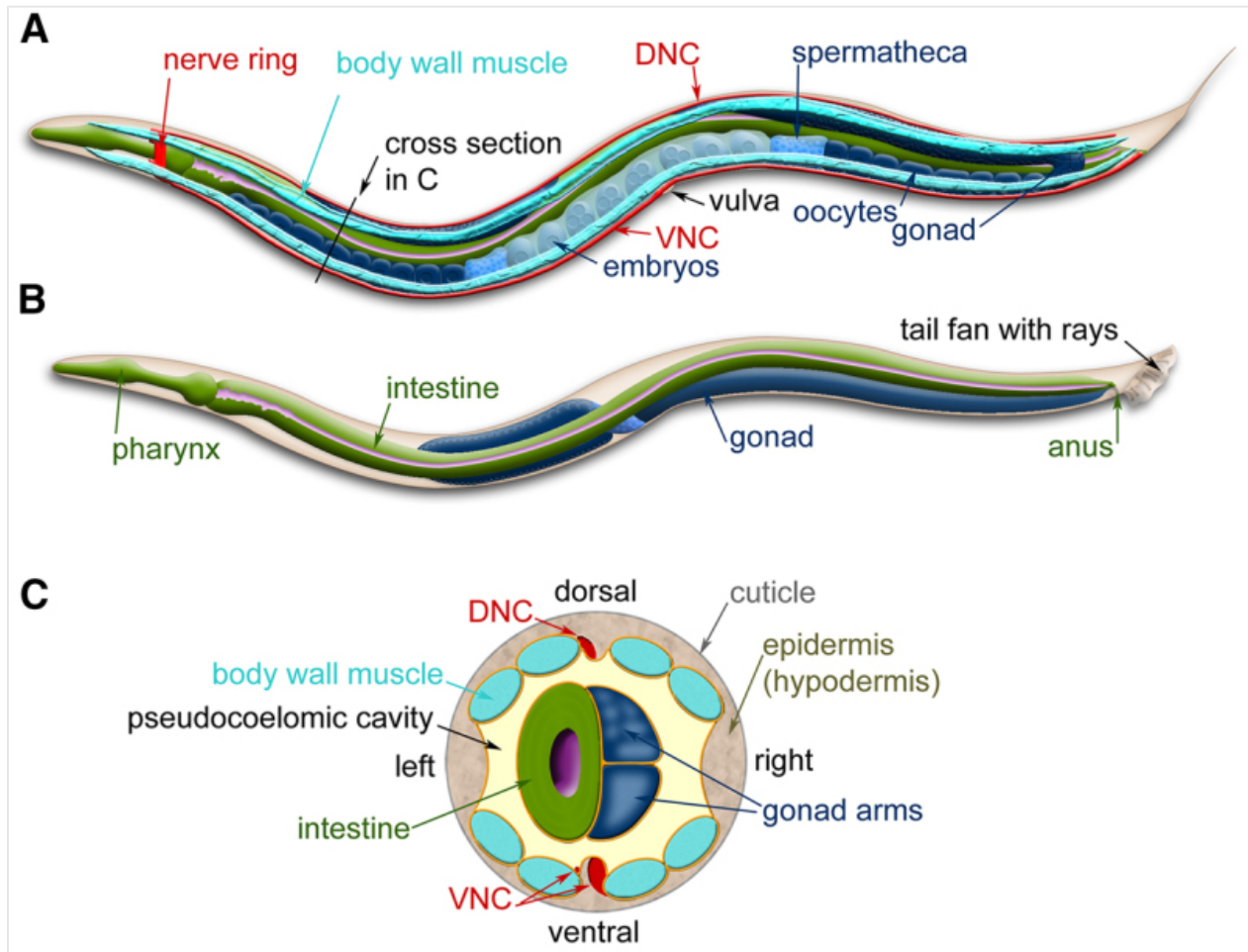


Figure 5. Anatomie de *C. elegans*

Principales caractéristiques anatomiques d'un hermaphrodite (A) et d'un mâle (B), le système nerveux et les muscles sont omis sur cette vue, qui révèle plus clairement le pharynx et l'intestin. (C) Coupe transversale de la région antérieure de l'hermaphrodite *C. elegans* (emplacement marqué par une ligne noire en A) montrant les quatre quadrants musculaires entourés par l'épiderme et la cuticule, l'intestin et la gonade étant logés dans la cavité pseudocœlomique. (Corsi, Wightman et al. 2015)

1.3.1 Cycle de vie

En laboratoire, *C. elegans* est cultivé sur des plaques d'Agar NGM (Nematode Growth Medium) et nourrit grâce à un tapis bactérien d'*Escherichia coli* (*E. coli*) (Gems and Riddle 2000). Les populations de vers sont maintenues à des températures entre 15 et 25°C; la maintenance à différentes températures influence principalement la vitesse de son développement. Un vers adulte de la souche sauvage peut concevoir jusqu'à 300 descendants grâce au sperme emmagasiné dans leur spermathèque (Corsi, Wightman et al. 2015). Lorsque l'œuf éclot, l'animal s'en retrouve à son premier stade larvaire (L1). La larve va ensuite se nourrir et passer par trois autres stades larvaires (L2-L4) (Figure 6). Le stade L1 dure environ 16 heures tandis que les autres stades sont d'environ 12 heures lorsque l'animal est bien nourri et maintenu à une température de 20°C. Une fois adulte, l'animal atteint une longueur de 1,3mm et pond pendant environ 2-3 jours. Après la période de reproduction, un hermaphrodite peut vivre plusieurs semaines. Le stade adulte est toutefois rarement observé dans la nature, car son développement nécessite des conditions optimales. Lorsqu'une jeune larve *C. elegans* est exposée à des conditions environnementales difficiles (manque de nourriture, température extrême, densité de population trop élevée), elle peut entrer dans un état de dormance alternatif au troisième stade larvaire (appelé « *dauer* ») (Burnell, Houthoofd et al. 2005). L'état du milieu est déterminé par des neurones chimio et thermosensibles (Albert and Riddle 1983). Si par exemple la nourriture vient à manquer, le développement *dauer* sera enclenché. Ce développement alternatif est contrôlé par deux voies de signalisation du système endocrinien : la voie TGF- β /DAF-7 et la voie de signalisation insuline IGF-1 (IIS) (Patterson and Padgett 2000). La physiologie et la structure de la plupart des cellules du vers, de même que sa durée de vie, seront alors modifiées. Le métabolisme du nématode change, lui permettant ainsi de vivre jusqu'à 3 mois, soit 4 à 8 fois plus longtemps qu'un vers normal (Hu 2007). Le *dauer* ne se nourrit pas et utilise comme source d'énergie les lipides qu'il entrepose dans son intestin et son hypoderme, le développement de la lignée germinale est mis sur pause et il apparaît majoritairement immobile (Narbonne and Roy

2009, Wolkow and Hall 2015). Cet état est toutefois réversible lorsque les conditions environnementales sont à nouveau favorables.

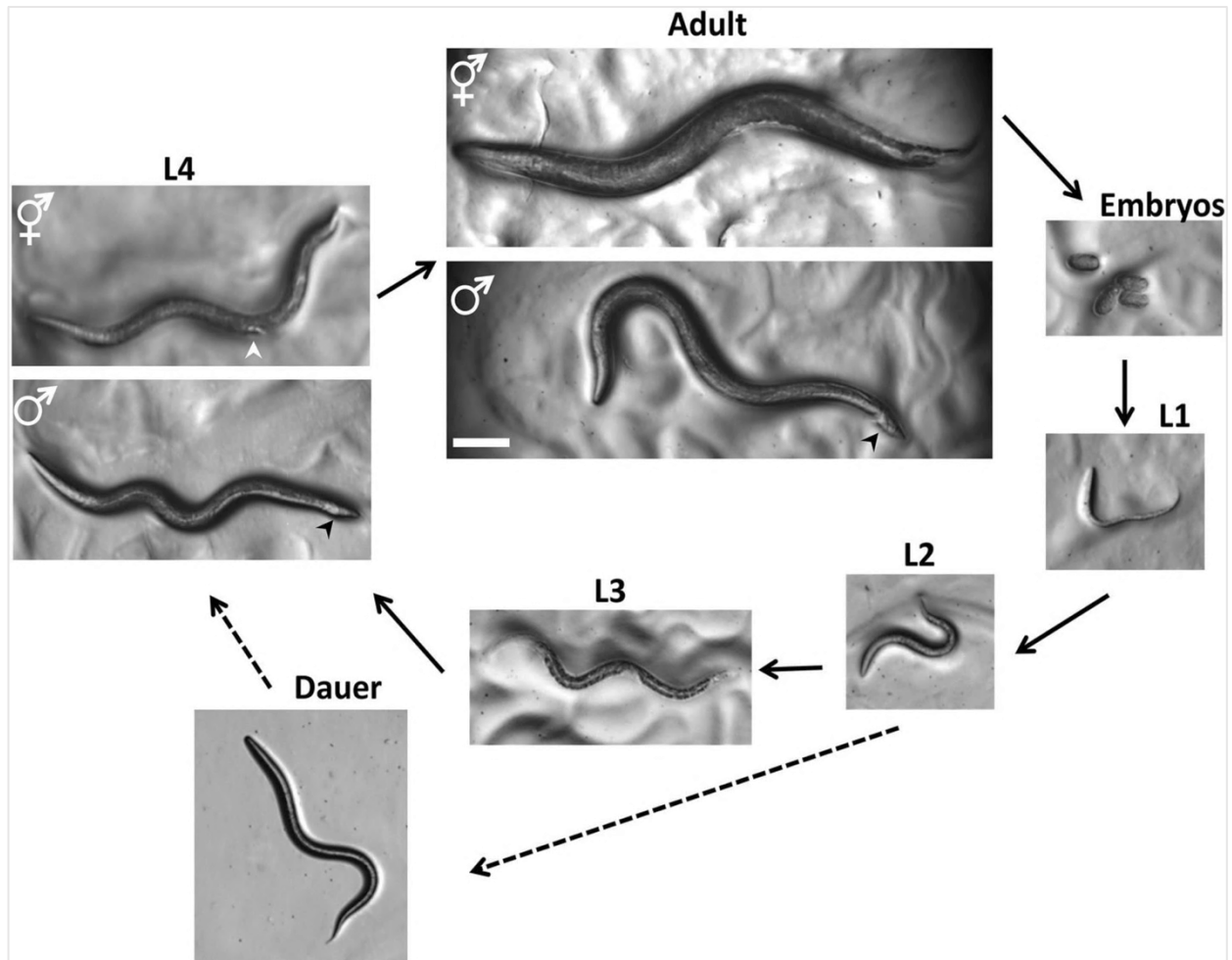


Figure 6. Cycle de vie du nématode *C. elegans*.

La taille de l'animal augmente tout au long des quatre stades larvaires, mais il n'est pas possible de facilement discernés le sexe des individus avant le stade L4. Au stade L4, on distingue les hermaphrodites par leur vulve en développement qui forme un petit croissant blanc (tête de flèche blanche); les mâles se distinguent par leur queue effilée à la circonférence plus large (tête de flèche noire). Les larves *dauer* sont plus minces que tous les autres stades larvaires. Ce stade alternatif et réversible ; les larves peuvent reprendre le cours normal de leur développement lorsque les conditions redeviennent favorables. (Corsi, Wightman et al. 2015)

1.3.2 Le développement de la lignée germinale

Le système reproducteur du *C. elegans* hermaphrodite peut être divisé en trois parties : la gonade somatique, la lignée germinale et l'appareil de ponte des œufs. La gonade somatique et la lignée germinale forment ensemble deux tubes symétriques en forme de U qui se rejoignent au centre de l'animal pour former l'utérus. Au moment de l'éclosion, l'appareil reproducteur de la larve contient les premières cellules germinales (Z2 et Z3) ainsi que les précurseurs de la gonade somatique (Z1 et Z4) (Schedl 1997, Hubbard and Greenstein 2000, Hubbard and Greenstein 2005). À la fin du stade L1, on distingue deux cellules à l'extrémité distale (distal tip cells – DTC) formées à partir des précurseurs somatiques Z1 et Z4. Les DTC sont importantes pour le développement de la lignée germinale ainsi que pour le contrôle de la prolifération des cellules souches germinales (CSG). Durant la croissance de l'animal, les DTC ainsi que d'autres cellules environnantes favorisent la prolifération de la lignée germinale. À la fin du stade L3, l'extension de la gonade somatique crée la formation de deux populations de cellule germinale ; les cellules dans la zone proximale de la gonade vont entrer en méiose tandis que les cellules germinales près de la DTC vont continuer à proliférer (Morrison and Kimble 2006). La production de sperme démarre durant le stade L4. La lignée germinale passe ensuite à la fabrication d'ovocytes lors du passage au stade adulte et pour le reste de son existence (Figure 7).

La lignée germinale adulte est un syncytium et présente une polarité distale proximale (Lints and Hall 2005). Une population de cellules mitotiques comprenant les cellules souches et leur progéniture mitotique située à l'extrémité la plus distale de la gonade tandis que des cellules en méiose s'étendent proximale à partir d'une zone de transition mitose-méiose. Parmi les cellules méiotiques se trouve également un gradient de progression méiotique avec des étapes successives de prophase méiotique s'étendant de la zone de transition, autour de la boucle et jusque dans le bras proximal de la gonade (Hansen, Wilson-Berry et al. 2004).

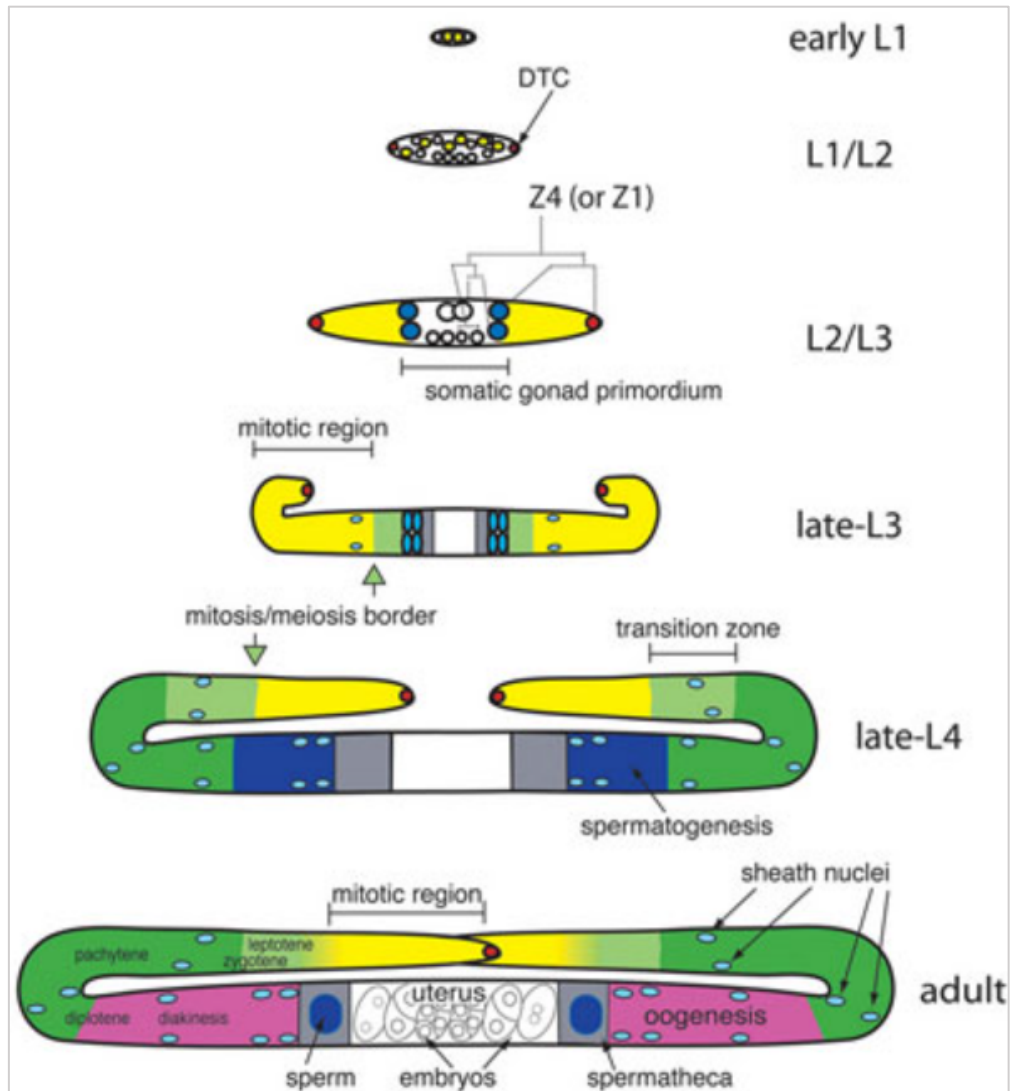


Figure 7. Développement de la lignée germinale.

Schéma de couleurs lignée germinale : région mitotique jaune, transition vert clair (prophase précoce de la méiose I), pachytène vert foncé, spermatogenèse bleu foncé et oogenèse rose. La frontière mitose/méiose est indiquée à la fin de L3 et à la fin de L4 par des flèches vert clair. La frontière mitose/méiose est indiquée ici par un dégradé de couleur jaune/vert. Schéma de couleurs des gonades somatiques : DTC rouge, cellules précurseurs de la gaine/spermathèque bleues, noyaux de la gaine somatique bleu clair, spermathèque grise et utérus blanc. Les noyaux germinaux et leur cytoplasme environnant sont souvent appelés « cellules germinales », bien qu'ils soient ouverts à un noyau de cytoplasme partagé (rachis) pendant une grande partie de leur développement. (Hubbard and Greenstein 2005)

1.3.3 Régulation de l'avenir des cellules souches germinales

C'est dans la partie distale de chacun des deux bras de la gonade que l'on trouve une population de cellules souches germinales (CSG) chez *C. elegans*. Elles ont deux avenir possibles : proliférer ou se différencier et devenir des gamètes. Le choix est assuré par la niche, une zone délimitée par l'étendue du signal produit par la DTC. Un vers possède deux DTC, chacune située au bout de la gonade antérieure ou postérieure. Ces cellules possèdent des prolongements cytoplasmiques autour des CSG et produisent des signaux qui définissent la zone d'inhibition de leur différenciation; tant que les CSG sont à la portée de ces signaux, elles se divisent de façon symétrique (Cinquin, Crittenden et al. 2010, Byrd, Knobel et al. 2014). Elles vont donc proliférer jusqu'à ce que se produise un débordement des cellules filles en dehors du champ d'action des signaux inhibitoires de la différenciation (Hubbard and Schedl 2019). Une fois hors de cette région, les cellules germinales entament leur programme de différenciation. Les cellules souches et leur progéniture qui entament le programme de différenciation, mais qui ne sont pas encore différenciées forment la zone appelée zone progénitrice (PZ) (Crittenden, Leonhard et al. 2006, Cinquin, Crittenden et al. 2010, Byrd, Knobel et al. 2014, Hubbard and Schedl 2019). À mesure qu'elles progressent vers la partie proximale du tube de la gonade, les cellules germinales vont finir par se différencier complètement et former les gamètes (sperme et ovocytes) (Crittenden, Eckmann et al. 2003).

La signalisation Notch contrôle la prolifération de la lignée germinale dans le développement larvaire, en plus d'être responsable de maintenir la population de CSG chez l'adulte (Austin and Kimble 1987, Kimble and Crittenden 2007). C'est cette signalisation qui définit la position de la zone mitotique (Lee, Sorensen et al. 2016). Cette signalisation localisée est accomplie par l'expression dans la DTC de ligands de signalisation, LAG-2 et APX-1, qui empêchent la différenciation des CSG en activant le récepteur Notch, GLP-1 (Henderson, Gao et al. 1994). LAG-2 est synthétisé par la DTC et inséré dans sa membrane. GLP-1 est synthétisé dans la lignée germinale et inséré dans les membranes des CSG (Austin and Kimble 1987, Crittenden, Troemel et al. 1994, Gao

and Kimble 1995). LAG-2 va ensuite se lier et activer GLP-1. Lorsqu'activé, son domaine transmembranaire est clivé et transloque au noyau. Ceci déclenche ensuite la répression de gènes normalement impliqués dans la différenciation cellulaire (Hansen, Wilson-Berry et al. 2004). La signalisation Notch induit donc les cellules germinales voisines à rester dans le cycle cellulaire mitotique.

1.3.4 Régulation de la prolifération des cellules souches germinales

Lorsque les cellules souches sont à portée des signaux de la niche, elles peuvent soit se diviser ou soit rester en quiescence. Certains facteurs de croissance peuvent promouvoir la prolifération des CSG tandis que l'absence de ceux-ci promeut la quiescence. On compte pour l'instant deux voies de signalisation capable de stimuler la prolifération des CSG (Figure 8). Une première voie de signalisation influence systématiquement la prolifération des CSG en fonction de la disponibilité des nutriments (Narbonne and Roy 2006, Michaelson, Korta et al. 2010). Les CSG auront tendance à proliférer chez un animal bien nourri tandis qu'un animal privé de nourriture présentera une prolifération plus faible. La seconde voie de signalisation est régulée la prolifération des CSG de manière plus localisées, et l'ajuste selon le besoin de l'organisme pour sa progéniture différenciée (Morgan, Crittenden et al. 2010, Cinquin, Chiang et al. 2016, Narbonne, Maddox et al. 2017).

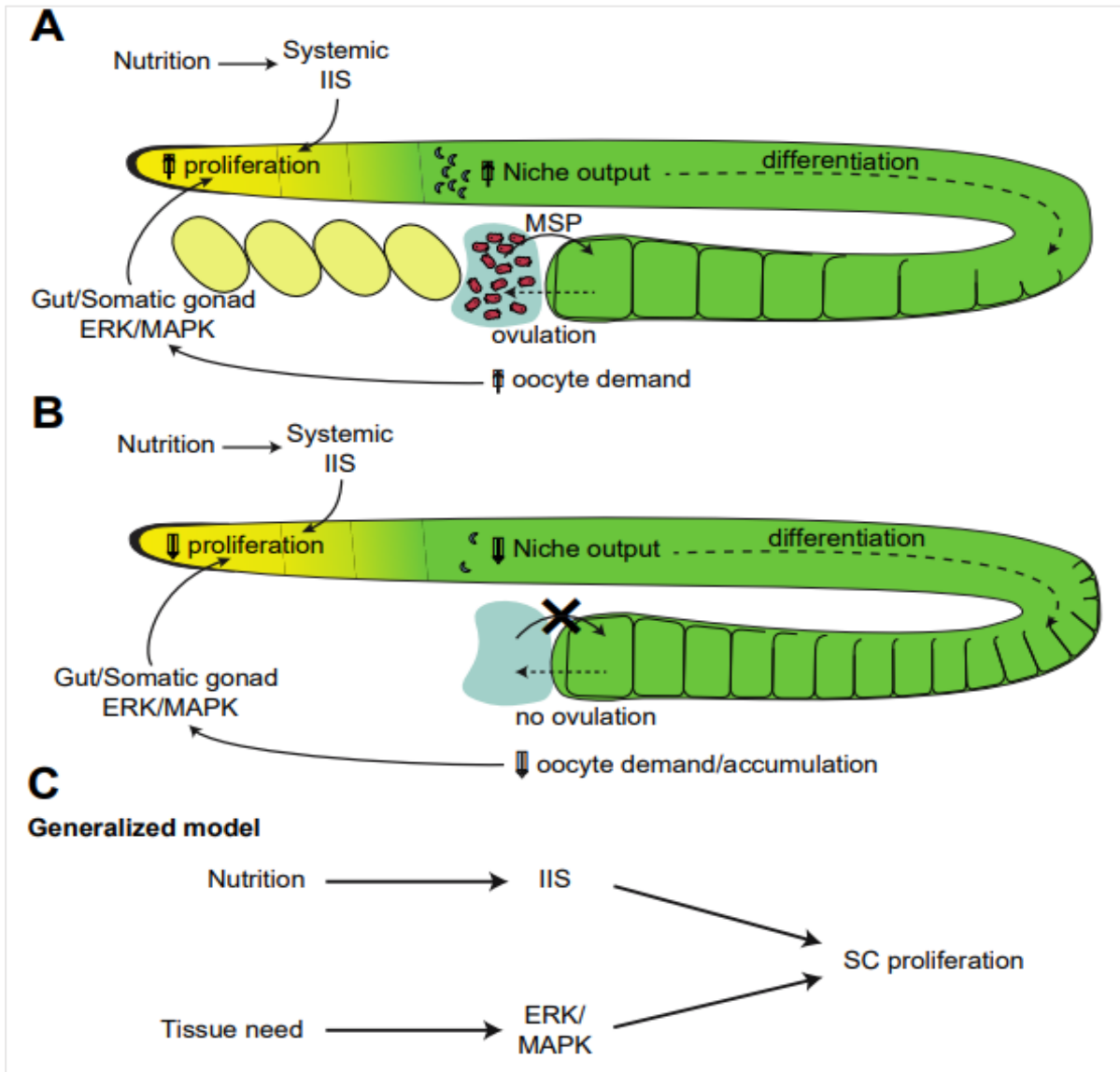


Figure 8. Mécanismes de régulation des cellules souches.

(A) Représentation schématique des deux mécanismes connus qui favorisent la prolifération des CSG. Les apports nutritionnels favorisent la prolifération des CSG en activant la voie IIS. La forte demande en ovocytes active également (par un mécanisme non connu) la voie ERK/MAPK qui favorise de façon non-autonome la prolifération des CSG. (B) Lorsque le sperme vient à manquer, les ovocytes s'accumulent, réduisant ainsi la demande du tissu. Hypothétiquement, cette accumulation mène à l'inhibition de la voie ERK/MAPK, diminuant donc la prolifération des CSG. (C) Modèle simplifié de la régulation de la prolifération des cellules souches par la nutrition et la demande tissulaire (Valet and Narbonne 2022).

1.3.4.1 Régulation systémique des cellules souches germinales

Durant le développement larvaire de l'hermaphrodite *C. elegans*, les CSG prolifèrent de manière ininterrompue pour former une population de progéniteurs qui pourra maintenir la production de gamètes lors de la période de reproduction de l'adulte. La voie de signalisation insuline IGF-1 (IIS) est activée en réponse à la présence de nutriments, afin de favoriser systématiquement la prolifération des CSG (Narbonne and Roy 2006, Michaelson, Korta et al. 2010). Dans ce système, si l'animal est bien nourri, le récepteur à l'insuline DAF-2 inhibe la translocation au noyau du facteur de transcription DAF-16/FOXO (Lin, Hsin et al. 2001, Narbonne, Maddox et al. 2017) DAF-16 joue un rôle dans l'inhibition de la prolifération des CSG, de la différenciation, de la progression mitotique et de la maturation des ovocytes. Lorsque les conditions environnementales deviennent difficiles ou que les nutriments viennent à manquer, la voie IIS est diminuée et le développement larvaire est mis sur pause (Narbonne, Maddox et al. 2015). Les CSG arrêtent momentanément leur cycle cellulaire afin de mieux préserver l'énergie de l'animal. La diminution de la prolifération des CSG par une signalisation IIS compromise nécessite donc en grande partie l'activité du facteur de transcription DAF-16 (Michaelson, Korta et al. 2010).

Chez l'adulte, le besoin en cellules souches différencié diminue et varie selon le besoin du tissu. D'autres facteurs sont alors requis pour assurer la quiescence des CSG, en aval ou en parallèle de la voie IIS. Parmi ceux-ci, on compte notamment DAF-18/PTEN, qui antagonise localement la voie IIS lorsque le besoin en ovocytes n'est plus présent (Fukuyama, Rougvie et al. 2006, Narbonne, Maddox et al. 2015). PAR-4/LKB1 et AAK-1/AMPK ont également leur rôle à jouer, sans que l'on sache exactement comment leurs activités viennent à promouvoir la quiescence des CGC (Narbonne and Roy 2006, Narbonne, Hyenne et al. 2010).

1.3.4.2 Régulation homéostatique localisée des cellules souches germinales

Chez l'hermaphrodite *C. elegans* adulte, la prolifération des CSG est également couplée avec la demande du tissu en ovocytes. Chez les animaux bien nourris, mais dont la spermathèque est vide, la prolifération des CSG diminue, et ce même si la voie IIS est encore activée (Narbonne, Maddox et al. 2015). Comme ils ne peuvent plus être fécondés, les ovocytes matures s'accumulent dans la partie proximale du bras de la gonade (Miller, Nguyen et al. 2001). Ceci provoque un signal de rétroaction spécifique, et donc localisé, au bras de la gonade déficiente en sperme afin d'abaisser le taux de prolifération des CSG dans la partie distale (Morgan, Crittenden et al. 2010, Cinquin, Chiang et al. 2016). Ce signal est indépendant dans chaque bras de la gonade, ce qui veut dire que le bras qui ne contient plus de sperme n'impactera pas la prolifération des CSG dans l'autre bras (Narbonne, Maddox et al. 2015).

L'accumulation d'ovocytes supprime le signal de la voie MPK-1 (Miller, Nguyen et al. 2001, Narbonne, Maddox et al. 2017). La protéine MPK-1, en plus de stimuler la prolifération des CSG, joue un rôle dans l'organogenèse somatique et la différenciation germinale. Son orthologue chez l'humain, la protéine ERK/MAPK (extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase), est un régulateur positif de la prolifération cellulaire pouvant être surstimulé dans le cancer (Schneider, Schmidt-Suppran et al. 2017). Chez le nématode, MPK-1 possède deux isoformes; MPK-1A et MPK-1B (Lackner, Kornfeld et al. 1994). L'isoforme spécifique à la lignée germinale, MPK-1B, favorise la différenciation cellulaire, mais n'a aucun effet sur la prolifération des CSG. C'est plutôt MPK-1A, l'isoforme spécifique aux tissus somatiques, qui agit à partir de l'intestin ou des cellules de la gaine somatique pour favoriser la prolifération des CSG (Robinson-Thiewes, Dufour et al. 2021).

Dans un jeune hermaphrodite bien nourri, la voie ERK/MAPK agit avec la voie IIS pour favoriser la prolifération des CSG. Toutefois, le mécanisme par lequel la signalisation homéostatique permet d'agir localement dans un tissu spécifique n'est pas encore bien connu (Robinson-Thiewes, Dufour et al. 2021). Chez *C. elegans*, MPK-1 stimule la

prolifération des CSG de manière cellulaire non autonome depuis l'intestin ou la gonade somatique de l'animal (Robinson-Thiewes, Dufour et al. 2021). L'intestin parcourt l'entièreté de l'animal tandis que chaque bras des gonades est entouré individuellement d'une gaine de cellules somatiques. Étant donné que l'activité de la voie semble être contrôlée indépendamment dans chaque bras de gonade, l'hypothèse favorisée est que la gonade somatique est le site probable où la suppression de ERK/MAPK peut se produire lors de l'accumulation d'ovocytes. Les cellules de la gaine somatique sont étroitement associées à la lignée germinale. Les cellules de la gaine ou leurs précurseurs favorisent la prolifération de la lignée germinale et la sortie du pachytène, de la gamétogenèse et du destin des gamètes mâles lors de la détermination du sexe de la lignée germinale (Seydoux, Schedl et al. 1990, McCarter, Bartlett et al. 1997).

1.4 Voie de signalisation ERK/MAPK

La voie de signalisation MAPK joue un rôle important dans le contrôle de différents procédés physiologiques au sein de la cellule tels que la croissance, le développement, la division ainsi que la mort (Keshet and Seger 2010, Plotnikov, Zehorai et al. 2011). La protéine ERK est un membre de la famille des MAPK et la voie de signalisation ERK/MAPK est très bien étudiée chez les vertébrés. En effet, les cancers humains présentent presque toujours une mutation activatrice dans l'un ou l'autre des acteurs de cette voie (Guo, Pan et al. 2020). Les étapes de transmission du signal suivent la cascade MAPK classique avec un récepteur RTK, une protéine commutatrice intracellulaire appartenant à la superfamille GTPasique ainsi que trois kinases principales, MAP3K, MAPKK et MAPK (Wortzel and Seger 2011). Dans la signalisation ERK, RAS joue office de protéine commutatrice, Raf agit comme MAP3K, MAPK/ERK kinase (MEK) agit comme MAPKK et ERK est MAPK, formant la voie Ras-Raf-MEK-ERK (Yang and Liu 2017).

La voie ERK/MAPK débute par l'activation d'un récepteur tyrosine kinase (RTK), comme le récepteur *Epidermal Growth Factor* (EGFR) (Figure 9b). Les RTK contiennent un site catalytique dans l'un de leurs domaines cytosoliques qui leur permettent d'exercer directement une activité tyrosine kinase. La plupart des RTK sont monomériques, et c'est

l'interaction d'un ligand avec leur domaine extracellulaire qui permet la formation d'un dimère fonctionnel. Lorsqu'un ligand comme EGF ou TNF α (*Tumor Necrosis Factor*) se fixe au EGFR, la dimérisation du récepteur active sa fonction kinase (Terrell and Morrison 2019). LE RTK activé va ensuite pouvoir auto-phosphoryler des résidus tyrosine dans son domaine cytosolique, et/ou cross-phosphoryler son partenaire dimérique. On observe ensuite le recrutement à la membrane plasmique de protéines intracellulaires chargées de la transduction des signaux. Ces protéines, comme GRB2 (*Growth Factor receptor bound protein 2*) se lient aux résidus phosphotyrosines dans les récepteurs grâce à leur domaine SH2 (*Src homology 2*), en plus de se lier à la protéine Sos (*Son of Sevenless*) cytosolique par son domaine SH3 (Terrell and Morrison 2019).

Ras est une petite GTPase qui possède une conformation active liée au GTP et une conformation inactive liée au GDP (Muñoz-Maldonado, Zimmer et al. 2019); la protéine peut alterner entre les deux conformations pour réguler la transduction du signal (Dohlman and Campbell 2019). La conversion du complexe Ras-GDP inactif en la forme active Ras-GTP est catalysé par la présence à la membrane de Sos, la protéine d'échange du nucléotide guanine (Simanshu, Nissley et al. 2017, Bandaru, Kondo et al. 2019, Terrell and Morrison 2019).

Ras-GTP se lie ensuite au domaine régulateur N-terminal de Raf, une sérine/thréonine kinase, et l'active (Roskoski 2010). Dans les cellules non stimulées, Raf est phosphorylée et fixée, dans un état inactif à 14-3-3, une protéine liant une phosphosérine (Stokoe and McCormick 1997, Vandamme, Herrero et al. 2014). L'hydrolyse de Ras-GTP en Ras-GDP libère Raf de son complexe avec 14-3-3, permettant ainsi à Raf de phosphoryler et activer MEK. Étant une protéine kinase à double spécificité, MEK est en mesure de phosphoryler ses cibles à la fois sur des résidus de tyrosine et de sérine/thréonine (Muta, Matsuda et al. 2019). MEK activée phosphoryle et active ERK, qui peut ensuite transloquer au noyau afin de phosphoryler à son tour différents facteurs de transcription tels que les oncogènes c-Myc, c-Jun, c-Fos, la protéine Elk-1 et le facteur de transcription dépendant de l'AMP cyclique ATF2 (Kolch 2000, Schulze, Lehmann et al. 2001, O'Neill and Kolch 2004). ERK cytoplasmique peut aussi effectuer un rétrocontrôle

négatif en phosphorylant d'autres protéines kinases en amont de la voie ERK, telles que SOS, Raf-1 et MEK pour les inhiber (Guo, Pan et al. 2020).

Chez *C. elegans*, la voie Ras-Raf-MEK-ERK est mieux connue pour son rôle central dans la détermination du destin des cellules vulvaires (Figure 9a). La vulve apparaît à la fin du dernier stade larvaire à partir de la spécialisation de six cellules hypodermiques ventrales le long de l'axe antéro-postérieur (Sternberg 2005). Le facteur de croissance LIN-3 est un homologue de l'EGF et est requis pour induire le signal entre la cellule d'ancrage gonadique et les cellules précurseurs vulvaires (Katz, Hill et al. 1995). La liaison de LIN-3 avec le récepteur LIN-23 exprimé dans les cellules précurseurs vulvaires y déclenche une cascade de signalisation dont les composants sont codés par les gènes *sem-5*, *let-60*, *lin-45*, *mek-2* et *mpk-1*. Leurs homologues chez le mammifère sont Grb2, Ras, Raf, MEK, ERK/MAP kinase respectivement (Han, Golden et al. 1993, Church, Guan et al. 1995, Kornfeld 1997). Les facteurs de transcription LIN-1 et LIN-31 sont les cibles de la protéine MPK-1. Avant l'activation de la voie de signalisation Ras/MAP kinase, LIN-1 et LIN-31 forment un complexe hétérodimérique afin d'inhiber l'induction vulvaire (Hart, Reventar et al. 2000). Les phosphorylations de LIN-1 et LIN-31 par MPK-1 entraînent ainsi une perturbation du complexe LIN-1/LIN-31 et la dérégulation des destins des cellules vulvaires. LIN-31 est donc un effecteur vulvaire spécifique de la signalisation MAPK qui interagit avec et régule l'activité de LIN-1 dans l'induction vulvaire (Miller, Gallegos et al. 1993, Tan, Lackner et al. 1998).

Ni LET-23 ni EGL-15, un autre RTK impliqué dans la signalisation MAPK chez *C. elegans*, ne contrôlent la progression des CSG dans le pachytène pendant la méiose germinale, laissant de nombreuses questions ouvertes pour le contrôle de cette voie (Church, Guan et al. 1995).

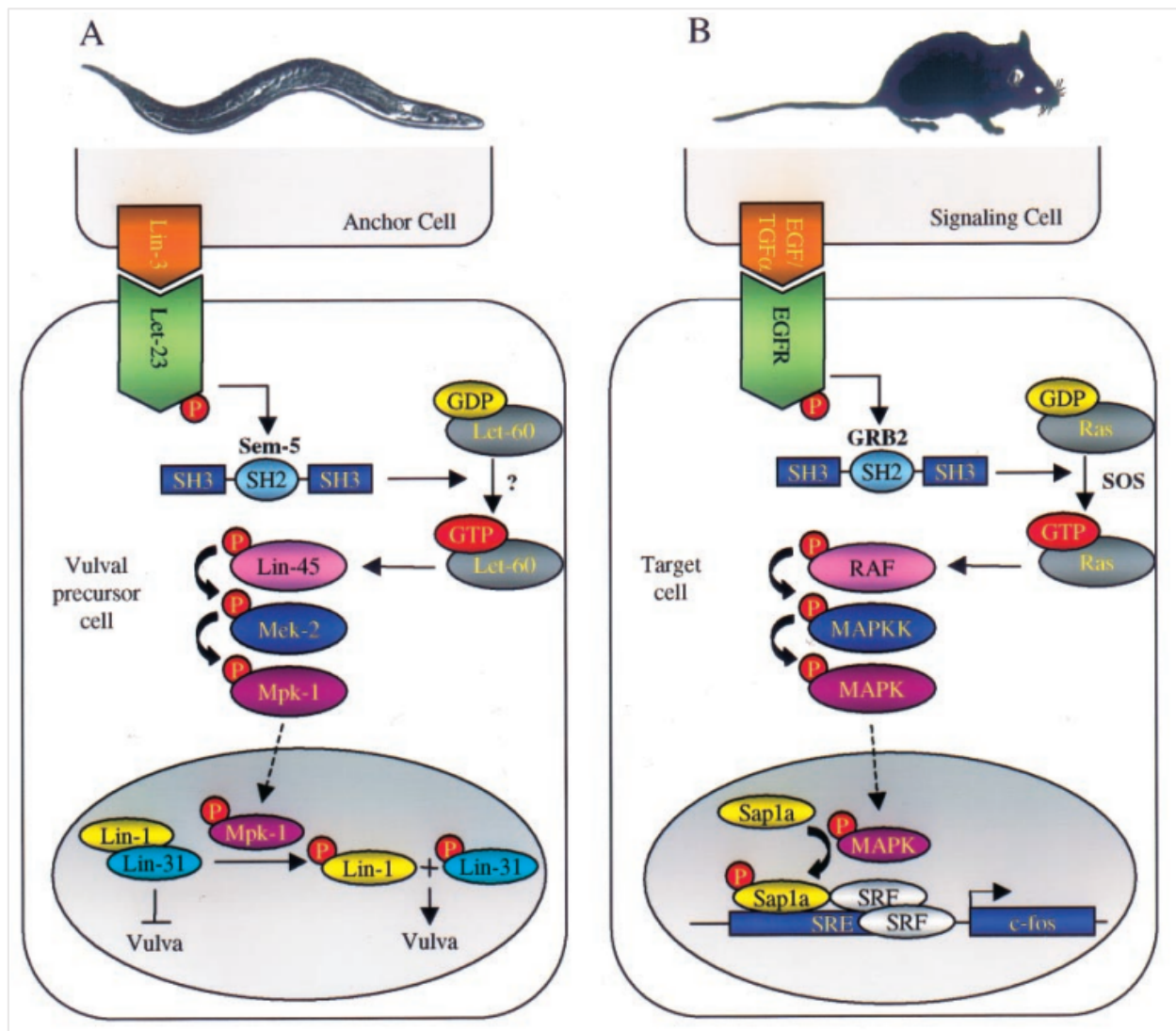


Figure 9. Signalisation Ras chez *C. elegans* et les mammifères.

(A) L'activation du récepteur LET-23 par LIN-3 initie un signal conservé de transduction entraînant la phosphorylation de la protéine ETS LIN-1 et l'induction vulvaire. (B) Activation de l'EGFR par un signal EGF ou TGFα dans les systèmes de mammifères utilise la même cascade de protéines de signalisation conservées pour phosphoryler l'ETS protéine Sap-1a favorisant la transcription de gènes cibles stimulant la croissance tels que *c-fos*. (Hart, Reventar et al. 2000)

1.5 Les jonctions communicantes

Durant le développement, les cellules se différencient en types distincts avec une composition, une structure et des fonctions qui leur sont propres. Les cellules d'un même type vont souvent se regrouper ensemble et exercer une fonction commune afin de former un tissu. Le transfert d'information entre différentes cellules ou entre des cellules et la matrice extracellulaire est important pour de nombreux principes biologiques, notamment la survie, la prolifération, la différenciation et la migration (Chaffey 2003). Il n'est donc pas surprenant que des déficiences dans le transfert d'informations causent des maladies, ou y contribuent, comme dans le cas du cancer (Mesnil, Crespín et al. 2005, Laird 2006, Sinyuk, Mulkearns-Hubert et al. 2018).

Les jonctions communicantes forment des canaux intercellulaires qui permettent le passage direct de petites molécules (1-2,5 kilodaltons) entre des cellules adjacentes. Chez les vertébrés, les jonctions communicantes sont constituées de connexines alors que chez les invertébrés, comme *C. elegans*, elles sont plutôt constituées par les innexines (Skerrett and Williams 2017). Les jonctions communicantes qui relient les cytoplasmes sont formées par l'arrimage bout à bout de deux hémicanaux, qui sont chacun appelés connexon/innexon. Ces derniers sont chacun composés de six à huit sous-unités entourant le pore central (Figure 10).

Les connexines et les innexines partagent une structure très similaire (Skerrett and Williams 2017, Beyer and Berthoud 2018). Quatre domaines transmembranaires ancrent la protéine dans la membrane; les deux boucles extracellulaires sont impliquées dans l'amarrage et les domaines cytoplasmiques contribuent à la régulation par des facteurs tels que les protons, la phosphorylation, le calcium et le voltage. Le domaine N-terminal est nécessaire pour la formation de jonctions communicantes fonctionnelles (Unwin and Zampighi 1980, Goodenough and Paul 2003) (Figure 10).

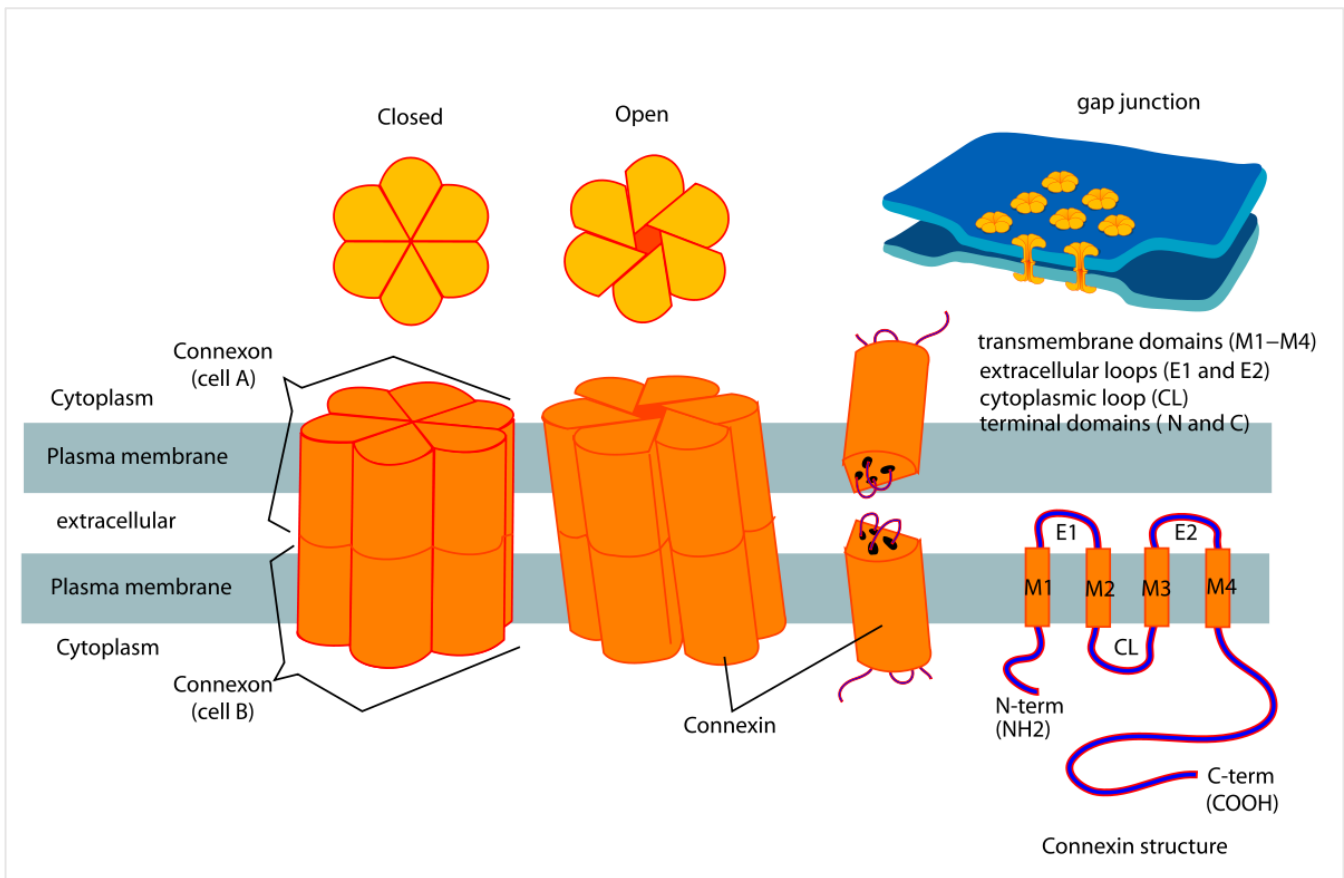


Figure 10. Connexine, connexon et jonctions communicantes.

Les connexons et les innexines peuvent également être appelés hémicanaux, ce qui signifie qu'il s'agit d'un assemblage de six protéines appelées connexines. Ces connexines/innexines forment un pore pour la jonction communicante qui se trouve entre le cytoplasme des cellules adjacentes. Ce canal qui se forme permet ainsi un flux bidirectionnel des ions entre les deux cellules et contribue également à la signalisation des molécules. La topologie membranaire d'une connexine/innexine comprend les domaines transmembranaires sont représentés comme des cylindres qui traversent la membrane. (Goodenough and Paul 2003)

Nous avons, pour l'instant, beaucoup de connaissances sur la structure, la fonction et les relations structure-fonction des connexons. Il y a toutefois peu de recherches qui se sont concentrées exclusivement sur les innexines. Malgré un manque de similitude dans la séquence des gènes, les connexines et les innexines sont remarquablement similaires (Skerrett and Williams 2017). Les vertébrés et les invertébrés expriment tous les deux plusieurs versions de protéines de jonction communicantes spécifiques à l'espèce, permettant ainsi plusieurs interactions possibles. Les modèles d'expression diffèrent au cours des étapes de développement et changent aussi en réponse aux signaux environnementaux (Bevans, Kordel et al. 1998). Certaines protéines de jonction communicantes jouent des rôles très spécifiques alors que d'autres sont exprimées dans une grande variété de tissus et de cellules (Epstein and Gilula 1977).

Les interactions entre les protéines de jonction communicante entraînent généralement la formation de canaux hétéromères et/ou hétérotypiques (White and Bruzzone 1996, Starich, Sheehan et al. 2001, Starich, Xu et al. 2009, Smith, Mohankumar et al. 2012). Les interactions hétéromériques impliquent l'oligomérisation de deux ou plusieurs isoformes dans un hémicanal alors que les interactions hétérotypiques impliquent des interactions entre différentes protéines dans les cellules adjacentes (figure 11) (Phelan and Starich 2001, Nielsen, Axelsen et al. 2012). Les canaux hétérotypiques offrent des opportunités uniques pour la modulation des propriétés des canaux, attestant de la nécessité de transport spécialisé entre les cellules de différents tissus et organes (Bouvier, Spagnol et al. 2009, Hall 2018). Le potentiel de telles interactions est souvent évalué lorsque des caractéristiques telles que le déclenchement, la perméabilité et la régulation révèlent des propriétés qui diffèrent de ceux de l'un ou l'autre des contributeurs individuels (homomère/homotypique) (Nielsen, Axelsen et al. 2012, Skerrett and Williams 2017).

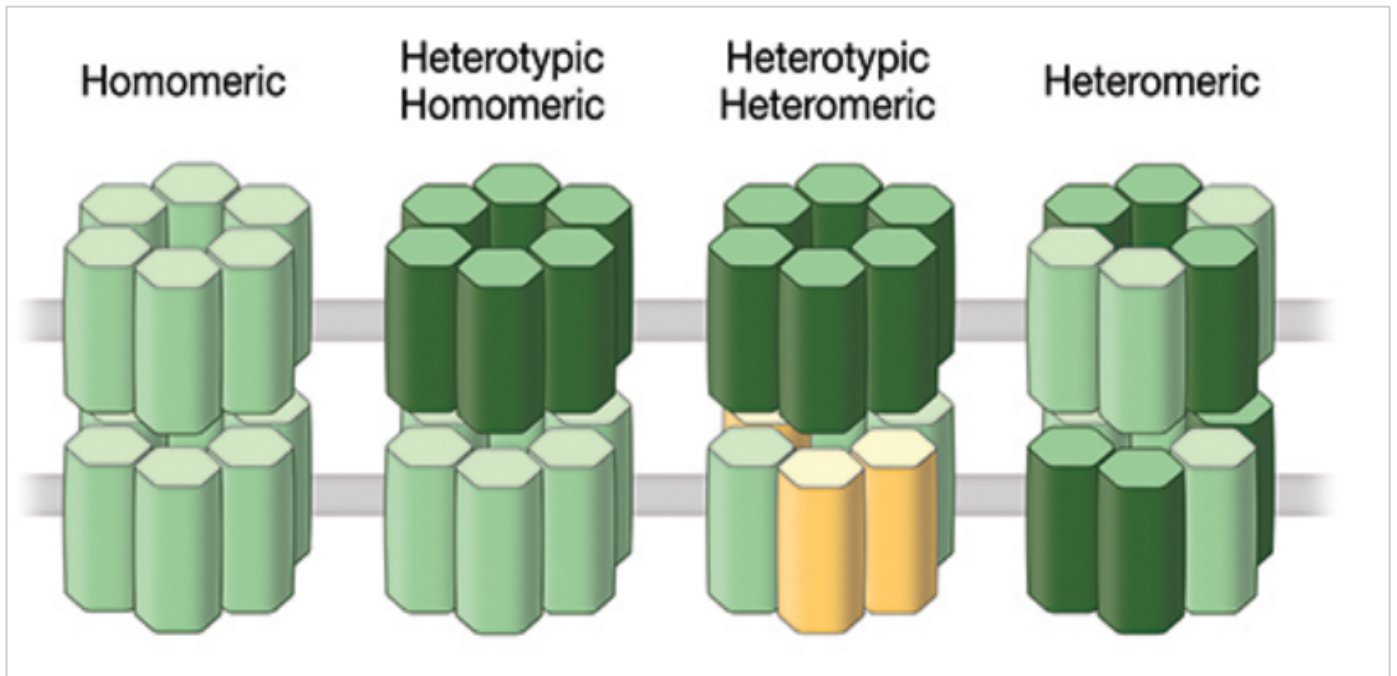


Figure 11. Modèle des jonctions communicantes.

Classification des canaux de jonction communicantes en fonction de leur composition en sous-unités comme homomères, hétérotypiques ou hétéromères. (Hall 2018)

Actuellement, il semble que les canaux à base d'innexine puissent être déstabilisés d'une manière similaire à celle des canaux de connexines (Skerrett and Williams 2017). Lors de premières études sur l'impact de la structure sur la fonction des jonctions communicantes composées d'innexine, certains des mutants créés affichaient des propriétés qui corrôlaient avec des observations obtenues lors d'étude sur les canaux formés de connexines. Le premier domaine transmembranaire (TM1) des connexines est plus serré que celui des innexines, cependant, des mutations dans TM1 peuvent produire des effets similaires sur la fonction dans les deux types de jonctions communicantes. Par exemple, des mutations au sein de TM1 des connexines et des innexines peuvent produire des canaux qui sont fermés, mais ouverts en réponse à la tension transjonctionnelle, un phénomène que l'on pense être lié à l'effondrement du canal via la perturbation des interactions entre les hélices (Skerrett and Williams 2017). De plus, des mutations

ponctuelles à certains emplacements dans les domaines transmembranaires des connexines et des innexines peuvent induire une fuite sensible au courant de calcium à travers la membrane plasmique de la cellule (Skerrett and Williams 2017).

1.5.1 Cancer et jonctions communicantes

Les cellules cancéreuses ont besoin d'établir une communication entre elles ainsi qu'avec leur environnement pour proliférer et stimuler la croissance tumorale. Les jonctions communicantes exercent trois principales fonctions. Elles permettent la communication intercellulaire (GJIC) entre les cellules, mais elles peuvent aussi former des hémicanaux entre la cellule et son environnement extracellulaire en plus de servir de site pour les interactions protéine-protéine nécessaire dans la régulation de certaines voies de signalisation (Sinyuk, Mulkearns-Hubert et al. 2018). Chaque fonction joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie de la cellule et le dysfonctionnement des jonctions communicantes dans chacun des axes décrits peut contribuer à une grande variété d'états pathologiques, y compris le cancer (Swietach and Monterisi 2019, Zhou, Zheng et al. 2023).

Dépendamment du contexte, chacune des trois fonctions des jonctions communicantes décrites précédemment peut agir à titre de suppresseur de tumeur ou comme un acteur favorisant la croissance et l'envahissement des cellules tumorales selon différentes sous-unités de connexine (Sinyuk, Mulkearns-Hubert et al. 2018). Par exemple, dans le cancer du poumon A549, l'expression de l'isoforme Cx43 renverse la transition épithéliale mésenchymateuse (TEM) et prévient l'établissement d'une résistance à la chimiothérapie (Yu, Zhang et al. 2014) tandis que l'expression de Cx26 dans les cancers du poumon HCC827 et PC9 induit la TEM via la signalisation PI3K – AKT (Yang, Qin et al. 2015). De la même manière, des effets spécifiques aux tissus doivent également être pris en compte : bien que Cx26 favorise la TEM dans les cellules cancéreuses du

poumon, il a été démontré qu'il diminue l'apparition de caractéristiques de type TEM dans les cellules cancéreuses du sein (McLachlan, Shao et al. 2006).

Les connexines pourraient servir de cible bénéfique pour le développement de nouvelles thérapies contre le cancer, soit en supprimant ou en augmentant leur expression et leur fonction (Zhou, Zheng et al. 2023). L'inhibition de la fonction GJIC et hémicanal obligerait les cellules à rester dans un isolement relatif et incapable de répondre à des conditions internes ou externes (Goodenough and Paul 2009). L'inhibition des interactions connexine-protéine, quant à elle, bien que sans doute plus difficile, pourrait conduire à des approches antitumorales plus spécifiques. Le blocage de ces contacts pourrait affecter les voies de signalisation critiques en aval des jonctions communicantes, notamment PKC, MAPK et Src, pour induire la mort des cellules tumorales tout en épargnant les cellules normales dépourvues du complexe connexine-protéine (Warn-Cramer, Lampe et al. 1996, Kanemitsu, Loo et al. 1997, Weng, Lauven et al. 2002).

1.5.2 Implication des jonctions communicantes chez *C. elegans*

Le génome de *C. elegans* possède 25 gènes codants pour des innexines. Toutes les cellules de l'animal expriment au moins un isoforme d'innexine et il n'est pas rare de voir plusieurs innexines exprimées dans la même cellule (Altun, Chen et al. 2009). Chez *C. elegans*, les jonctions communicantes sont souvent hétéromères ou hétérotypiques (Hall 2017), mais on sait relativement peu de choses sur les combinaisons de sous-unités d'innexine compatibles au sein d'un même canal (Koval, Molina et al. 2014). La petite taille des cellules du nématode rend l'étude des innexines plus difficile que dans d'autres organismes étant donné que certaines jonctions communicantes sont si petites qu'elles sont très difficiles à détecter avec les méthodes actuelles (Hall, Winfrey et al. 1999).

Dépendamment de leur emplacement dans le ver, les jonctions communicantes composées d'innexines peuvent jouer différents rôles. Les jonctions communicantes de

plus grosses dimensions retrouvées au niveau du système excréteur peuvent permettre le transfert de fluide, d'ions ou de petites molécules entre des cellules dissemblables (Hall 2017). Dans le système nerveux, elles peuvent former des connections entre deux neurones ou entre un neurone et une cellule gliale, formant un modèle de connectivité qui s'apparente à celui de la jonction chimique (synapse) (White, Southgate et al. 1986). Dans d'autres régions comme les muscles, les jonctions communicantes peuvent être impliquées dans des processus métaboliques en jouant un rôle unique dans le couplage de réseaux de cellules, soit pour synchroniser les activités, soit pour fournir une voie de propagation des signaux indépendante du réseau de synapses chimiques (Liu, Chen et al. 2011). Finalement, les jonctions communicantes des nématodes peuvent aussi avoir une fonction d'hémicanal, comme dans le cas des récepteurs d'étirement (Richter, Kiefer et al. 2014, Sangaletti, Dahl et al. 2014). L'innexine *unc-7* peut agir comme un hémicanal dans plusieurs neurones sensoriels différents, y compris des cellules responsables de la détection du toucher. L'hémicanal *unc-7* par exemple, y agit en tant que récepteur pour le toucher léger, le toucher brusque ou les deux (Walker and Schafer 2020).

Les jonctions communicantes sont aussi impliquées lors du développement, notamment pour l'intégralité de la structure des tissus. Au stade embryonnaire, au moment ou à proximité du moment où elles entament la migration de leur lieu de naissance, toutes les cellules semblent pouvoir communiquer avec leurs voisines via des jonctions communicantes afin de dessiner des groupements fonctionnels juste avant que les tissus ne commencent à se former (Bischoff and Schnabel 2006). Une hypothèse serait que les jonctions communicantes pourraient jouer un rôle accessoire dans la communication intercellulaire entre les cellules indifférenciées pour favoriser le tri cellulaire ou pour améliorer le regroupement cellulaire au début de la morphogenèse (Hall 2017). La perturbation du couplage de la jonction communicante semble aussi affecter l'adhésion cellulaire, et les défauts de communication intercellulaire qui en résultent ne sont pas nécessairement liés au passage des molécules à travers les canaux jonctionnels (Meyer, Laird et al. 1992). Des exemples chez *C. elegans* donnent aux

jonctions communicantes un rôle dans l'adhésion de la motilité cellulaire du stade précoce de l'embryogenèse (Starich, Miller et al. 2003, Tolkin, Mohammad et al. 2022).

La formation de connections entre la gonade somatique et les CSG est essentielle pour le bon développement de la lignée germinale. Des petites jonctions communicantes relient la DTC aux cellules germinales en division à l'extrémité distale du bras de la gonade, tandis d'autres relient les cellules de la gaine somatique à la lignée germinale en développement. Les jonctions communicantes gonadiques ont été impliquées dans la prolifération des cellules germinales, la croissance des ovocytes, la régulation de la maturation méiotique des ovocytes, l'embryogenèse précoce et le guidage du sperme (Govindan, Cheng et al. 2006, Nadarajan, Govindan et al. 2009, Edmonds, McKinney et al. 2011, Starich, Hall et al. 2014). L'établissement de la communication entre le soma et la lignée germinale implique cinq innexines. INX-14 est présente dans toutes les cellules germinales et requiert une association avec INX-21, dans la partie distale de la gonade, ou INX-22, dans la partie proximale, afin de former une jonction communicante fonctionnelle avec les innexines exprimées dans les tissus de la gaine somatique, INX-8 et INX-9 (Figure 12) (Starich, Hall et al. 2014). La classe de jonctions communicantes près de la DTC est impliquée dans le contrôle de la prolifération des cellules souches tandis que la seconde classe située plus en région proximale de la gonade est favorise la différenciation et la maturation des ovocytes. L'inactivation génétique de l'une ou l'autre de ces cinq gènes innexines entraîne des défauts systématiques de la maturation des cellules germinales.

Les CSG sont également toutes connectées entre elles au sein de la lignée germinale via un syncytium central, le « rachis » (Hall, Winfrey et al. 1999). Cette voie de communication est toutefois indépendante des innexines, étant plutôt médiée par un pont cytoplasmique. Le rachis permet d'acheminer du cytoplasme depuis les cellules nourricières qui se sacrifient par apoptose vers les ovocytes pour assurer leur croissance rapide. (Hall, Winfrey et al. 1999)

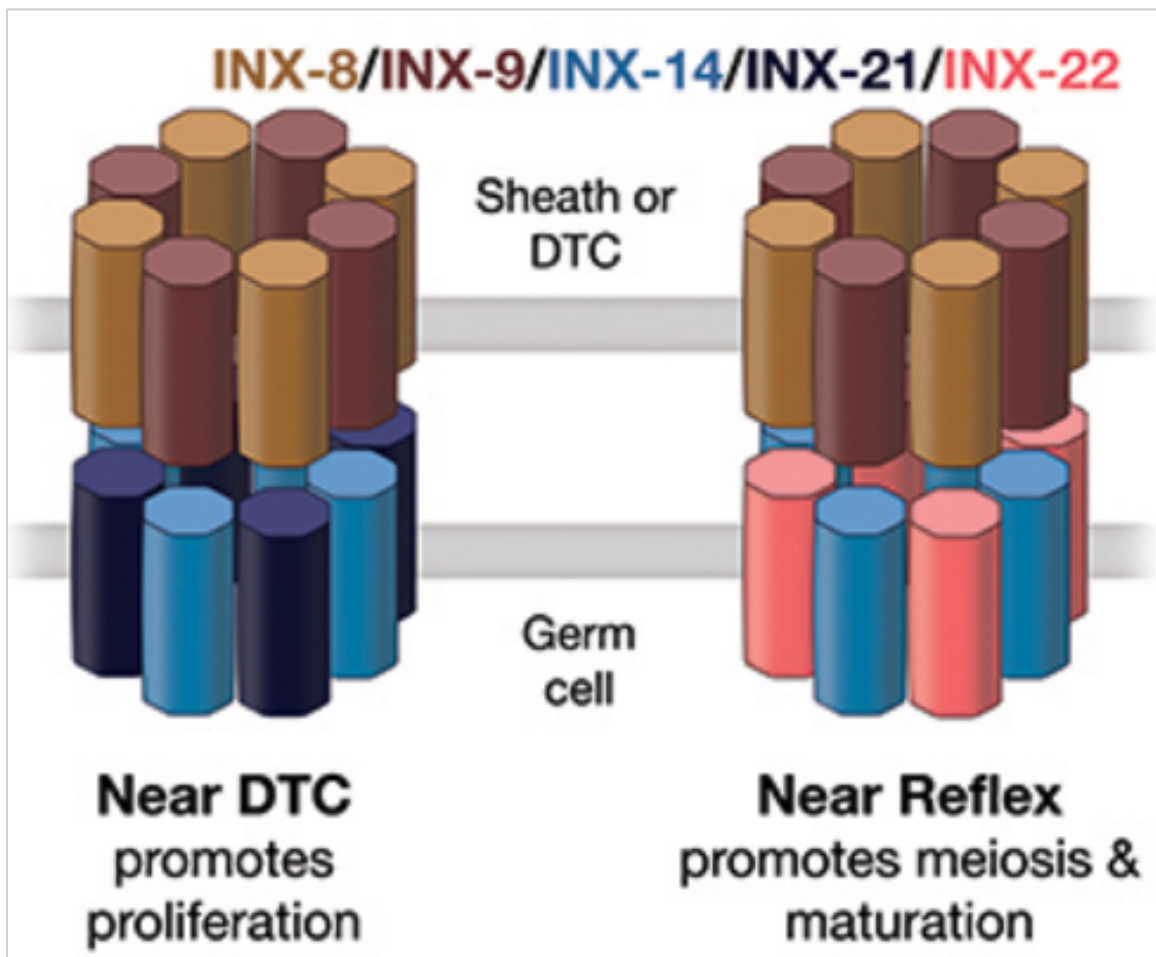


Figure 12. Jonctions communicantes hétérométriques situées dans la gonade.

Un canal de jonction communicante typique se compose de deux protéines d'innexine différentes dans un hémicanal (du côté de la lignée germinale) et d'une paire différente de protéines d'innexine dans l'hémicanal opposé (du côté de la gaine des gonades) (Hall 2018).

CHAPITRE II

2.1. Problématique et hypothèse de recherche

ERK/MAPK (extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) est un régulateur positif de la prolifération cellulaire pouvant être suractivé dans le cancer. Chez *C. elegans*, son orthologue, MPK-1, peut stimuler la prolifération des cellules souches germinales (CSG) de façon cellulaire non autonome, depuis l'intestin ou la gonade somatique de l'animal. Cependant, comment MPK-1 peut-il effectuer cette tâche depuis l'un ou l'autre de deux tissus voisins est une question qui demeure nébuleuse.

De façon notoire, il existe des jonctions communicantes interconnectant la gonade somatique à la lignée germinale. Ces dernières sont d'ailleurs essentielles à la prolifération des CSG. Chez les vertébrés, les jonctions communicantes sont formées par les connexines, tandis que chez les invertébrés comme *C. elegans*, elles sont formées par les innexines (Phelan 2005). Bien que les deux types de complexes partagent des similarités structurales, il n'y a aucune homologie au niveau de la séquence des acides aminés entre les connexines et les innexines (Skerrett and Williams 2017). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'activité de MPK-1 pourrait stimuler de manière non autonome la prolifération de la lignée germinale via la régulation d'une petite molécule qui pourrait être partagée entre les deux tissus somatiques et la lignée germinale, et donc être produite dans l'un ou l'autre des deux tissus somatiques.

Chez la souris, cependant, ERK/MAPK phosphoryle les connexines afin de moduler l'ouverture des jonctions communicantes lors de la cicatrisation épidermique (Lastwika, Dunn et al. 2019). Par analogie, nous avons émis l'hypothèse alternative que l'activation de MPK-1A pourrait aussi moduler, chez *C. elegans*, les jonctions communicantes pour permettre la diffusion de petites molécules pro-prolifératives non identifiées depuis

l'intestin vers les CSG. Ainsi leur production pourrait stimuler la prolifération des CSG, qu'elles soient produites dans l'intestin ou la gonade somatique.

Objectif de la recherche: Étudier la diffusion de petites molécules entre l'intestin et la lignée germinale chez le nématode *C. elegans*

Dans l'optique de tester ces hypothèses, nous avons d'abord voulu vérifier expérimentalement le patron de diffusion d'une petite molécule fluorescente imperméable aux membranes, la 5-carboxyfluorescein (5-CF), suite à sa micro-injection dans l'intestin de l'animal. Jusqu'ici, nos résultats démontrent que la CF passe de l'intestin à la lignée germinale et vice-versa. De façon intéressante, nous avons remarqué que le patron de diffusion diffère dans certaines souches dans lesquelles la prolifération des CSG est perturbée, mais que ces différents patrons de diffusion ne semblent pas reliés au niveau de prolifération des CSG. De plus amples analyses devraient nous permettre d'établir si des petites molécules cellulaire-imperméables pourraient réguler la prolifération des CSG en aval de la voie MPK-1.

2.2. Article scientifique

Bidirectional transfer of a small membrane-impermeable molecule between the *C. elegans* intestine and germline

Sarah Turmel-Couture, Pier-Olivier Martel, Lucie Beaulieu, Xavier Lechasseur & Patrick Narbonne*

Département de Biologie Médicale, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC, G8Z 4M3, Canada

* Correspondence should be addressed to: patrick.narbonne@uqtr.ca

Running title: Transfer of 5-CF between the *C. elegans* gut and germline

Key words: *Caenorhabditis elegans*, germline, intestine, sheath cells, stem cells, gap junctions, cell signaling, ERK/MAPK, 5-Carboxyfluorescein

Abstract

The extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase (ERK\MAPK) is a positive regulator of cell proliferation that is often upregulated in cancer. In *C. elegans*, its ortholog MPK-1 stimulates germline stem cell (GSC) proliferation cell non-autonomously, from the animal's intestine or somatic gonad. How MPK-1 performs this task from either of these two tissues, however remains unclear. Yet, gap junctions connect the somatic gonad to the germline, while these junctions are essential for GSC proliferation. As such, we reasoned that somatic MPK-1 activity could generate pro-proliferative small molecules that could diffuse from the intestine and/or somatic gonad to the germline. Here, in support of this hypothesis, we demonstrate that a fraction of the small membrane-impermeable fluorescent molecule, 5-carboxyfluorescein (5-CF), transfers to the germline after its microinjection in the animal's intestine. The larger part of this transfer requires the RME-2 yolk receptor, but another significant part occurs independently, through an unknown route. We further show that the intestine-to-germline transfer efficiency of this RME-2 independent fraction does not vary together with GSC proliferation rates or MPK-1 activity, indicating that its regulation is not responsible for establishing GSC proliferation rates. Finally, we show that conversely, a similar fraction of germline injected 5-CF transfers to the intestine, demonstrating the bidirectionality of this exchange. Altogether, our results establish the possibility of a specific intestine-to-germline signaling axis mediated by small membrane-impermeable molecules that could promote GSC proliferation cell non-autonomously downstream of MPK-1 activity by transferring between these tissues, including through gap junctions.

Introduction

The transfer of information between adjacent and distant cells is important for many biological processes in multicellular organisms, including survival, proliferation, differentiation, and migration (Francis and Palsson 1997, Mittelbrunn and Sánchez-Madrid 2012). It is therefore not surprising that defects in information transfer contribute to several diseases, including cancer (Mesnil, Crespin et al. 2005, Laird 2006, Sinyuk, Mulkearns-Hubert et al. 2018).

Intercellular communication between adjacent cells can be facilitated by intercellular channels called gap junctions (Laird 2006). Gap junctions are formed by six to eight transmembrane subunits that assemble into a circular hemichannel, creating a small opening in the cell membrane (Harris 2001, Oshima, Matsuzawa et al. 2016). Hemichannels in adjacent cells associate together to form transmembrane channels, effectively connecting their cytoplasm, and allowing for the exchange of small membrane-impermeable molecules, such as ions, second messengers and small metabolites.

In vertebrates, gap junction subunits are called connexin, while the term innexin is used in invertebrates (Panchin, Kelmanson et al. 2000). Even though these two families share little sequence homology, they have a similar structure (Oshima, Matsuzawa et al. 2013, Skerrett and Williams 2017, Beyer and Berthoud 2018). Structure-function analyses further suggest that connexin and innexin channels are regulated through similar mechanisms (Depriest, Phelan et al. 2011, Skerrett and Williams 2017). Connexin and innexin subunits consist of four transmembrane helices (Oshima, Tani et al. 2007), two extracellular loops containing cysteine residues that are required for intercellular docking (Phelan and Starich 2001, Phelan 2005, Yen and Saier 2007), and cytoplasmic N- and C-termini domains (Bauer, Löer et al. 2005, Simonsen, Moerman et al. 2014). In Connexins, these cytoplasmic domains adjust the channel's opening, an activity termed gating (Saez, Berthoud et al. 2003, Peracchia 2004). Changes in the pH, calcium concentration and voltage within the gap junction pore can further regulate gating (Hertzberg, Lawrence et al. 1981, Peracchia, Wang et al. 2000, Kwon, Roux et al. 2012). Gap junction assembly, turnover, conductance and selectivity are also dynamically adjusted by a range of post-translational modifications, including phosphorylation (Goodenough, Goliger et al. 1996, Dunn, Su et al. 2012, Leithe, Mesnil et al. 2018). This level of regulation is of primary importance since several pathologies are caused by mutations affecting gap junction post-translational modifications sites (Locke, Bian et al. 2009, Remo, Qu et al. 2011, Aasen, Johnstone et al. 2018).

Gap junctions coordinate many tissue- and organismal-scale events. Within the mammalian heart, for instance, gap junctions are critical for electric impulse conductance between cardiomyocytes (Kanno and Saffitz 2001). At the organismal scale, gap junctions notoriously permit soma-germline communication. These gap junction-mediated soma-germline interactions play a critical role in the formation of functional gametes as their disruption can lead to infertility or tumor formation (Schulz, Wood et al. 2002, Jemc 2011). For example, in the *Drosophila* testis, the coupling of germ gap junction protein Zero

population growth (Zpg), with somatic Innexin 2, is required at multiple spermatogenesis steps (Smendziuk, Messenberg et al. 2015, Pesch, Dang et al. 2022), while in the mouse ovary, the lack of Connexin 37 junctions between oocytes and granulosa cells blocks oocyte development and prevents ovulation (Simon, Goodenough et al. 1997).

Caenorhabditis elegans is an excellent simple model to study soma-germline interactions. In the *C. elegans* hermaphrodite, the germline is comprised within two U-shaped somatic gonadal arms. Distinct germline stem cell (GSC) populations are found at the distal end of each gonad arm. GSCs have two possible fates: they can proliferate to expand in numbers or differentiate to become gametes. This decision is controlled by the expression of a Notch ligand, LAG-2, by distal tip cells (DTCs), located at the distal extremities of each gonad arm (Kimble and White 1981, Kimble and Crittenden 2005, Byrd and Kimble 2009). GSCs will therefore proliferate until their daughter cells are displaced beyond this niche signal range and launch their differentiation program (Hubbard and Schedl 2019). The distal germline region encompassing the GSCs and their proliferating progeny is termed the progenitor zone (PZ) (Crittenden, Leonhard et al. 2006, Byrd, Knobel et al. 2014, Hubbard and Schedl 2019). Germ cells therefore mature as they move along the distal-proximal axis of the gonad to eventually turn into sperm during larval stages, and oocytes during adulthood. As part of the somatic gonad, 12 sheath cells assemble in a thin layer around each proximal arm, and are critical for germline growth, organisation, and function (Kimble and White 1981, McCarter, Bartlett et al. 1997, Hall, Winfrey et al. 1999). Interestingly, the innexins that localize to the soma-germline interface are required for GSC proliferation and differentiation, including for oocyte maturation (Crittenden, Eckmann et al. 2003, Nadarajan, Govindan et al. 2009, Starich, Hall et al. 2014, Hall 2017) and as such, they may mediate a large part of the essential soma-germline interactions.

In addition to requiring gap junction connections with the somatic gonad, GSC proliferation is regulated by two parallel pathways in *C. elegans* (Narbonne and Roy 2006, Michaelson, Korta et al. 2010, Narbonne, Maddox et al. 2015, Narbonne, Maddox et al. 2017). Nutrition promotes GSC proliferation by activating the insulin/IGF-1 signaling (IIS) pathway within GSCs (Drummond-Barbosa and Spradling 2001, Narbonne and Roy 2006, Michaelson, Korta et al. 2010), and in parallel, the extracellular signal-regulated kinase (ERK)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) non-autonomously promotes GSC proliferation from the soma (Narbonne, Maddox et al. 2017, Robinson-Thiewes, Dufour et al. 2021). The *C. elegans* genome encodes a single ortholog of mammalian ERK1/2 MAPKs, MPK-1, which activity is required in the animal's intestine or somatic gonad to promote GSC proliferation (Robinson-Thiewes, Dufour et al. 2021). As such, we hypothesized that MPK-1 activity could non-autonomously stimulate germline proliferation via the regulation of a small molecule that could be shared between both somatic tissues and the germline, and hence be produced in either of the two somatic tissues. In mice, however, it was recently found that ERK/MAPK directly phosphorylates connexins to modulate gap junction openings during epidermal wound healing (Lastwika,

Dunn et al. 2019). As such, somatic MPK-1 activity could alternatively promote GSC proliferation through modulating soma-to-germline gap junction gating.

Both hypotheses anyhow depend on the presence of a functional coupling between the *C. elegans* intestine and germline, potentially through the somatic gonad and gap junctions. Intestinal cells are coupled together by INX-16 junctions(Peters, Teramoto et al. 2007). The somatic gonad expresses INX-8/INX-9 hybrid hemichannels that connects it to the germline via INX-14/INX-21 and INX-14/INX-22 hybrid hemichannels in the distal and proximal germline, respectively(Byrd, Knobel et al. 2014, Starich, Hall et al. 2014). Although both the intestine and the somatic gonad express innexins, there is no evidence for a direct coupling of the intestine to the somatic gonad via gap junctions(Hall, Winfrey et al. 1999, Altun, Chen et al. 2009, Hall 2017). Nonetheless, we evaluated here the diffusion pattern of a small membrane-impermeable fluorescent molecule, 5-carboxyfluorescein (5-CF), following its microinjection into the animal's intestine and germline. We found that surprisingly, a significant fraction of 5-CF transferred from the intestine to the germline and vice-versa. Moreover, the dye did not appear to accumulate into other tissues of the animal, suggesting the existence of a specific bi-directional small membrane-impermeable molecule exchange between the intestine and germline, likely via the somatic gonad, and which could be implicated in the regulation of GSC proliferation.

Results

A small membrane-impermeable molecule transfers from the intestine to the germline

Innexin based gap junctions allow for the passage of small molecules and ions of up to 2 kDa(Bossinger and Schierenberg 1996, Starich, Hall et al. 2014). We selected 5-CF, a small membrane-impermeable(2010) green fluorescent dye having a molecular size of 0,376 kDa, as a molecule that could diffuse from one cell to another through gap junctions. Moreover, 5-CF was successfully used to visualize diffusion through pharyngeal innexins in *C. elegans*(Li, Dent et al. 2003).

We first asked whether 5-CF could transfer from the intestine to the germline. We microinjected 30-50 picolitres(Mello, Kramer et al. 1991) of a saturated 5-CF solution in the intestine of wild type adult hermaphrodites near the vulva, and allowed animals to recover for an hour before imaging them (Fig. 1A-B) (see Experimental procedures for details). We then measured the relative fluorescence intensity in the whole animal, in the intestine near the injection site, as well as in the following parts of the germline in both gonad arms: pachytene region, proximal oocytes and distal eggs (Fig. 1C-G). By first measuring the whole animal fluorescence, we controlled that the injected volume of 5-CF was sufficient to be easily detected after the recovery time and was well above the background autofluorescence (Fig. 1C). This also allowed to normalize for fluctuations in the injection volume between individuals. An intense fluorescence signal was detectable near the injection site in the intestine after the recovery period, while the dye obviously

spread across the whole intestine (Fig. 1B, D). A weaker signal was also detectable in the germline pachytene area (Fig. 1A'-B', I-J) and proximal oocytes (Fig. 1 A-B, K-L), and a strong signal was present in the distal eggs (Fig. 1A-B, M-N). The presence of dye in the distal-most eggs, despite their impermeable eggshell, likely originates from uptake before they were fertilized as we expected the fertilization of 1-3 new oocytes per gonad arms to occur during the recovery period (McCarter, Bartlett et al. 1997, Kim, Spike et al. 2013). We draw three conclusions from this experiment. First, the roughly even spread of 5-CF throughout the intestine confirms that intestinal cells are interconnected by gap junctions (Peters, Teramoto et al. 2007, Altun, Chen et al. 2009, Simonsen, Moerman et al. 2014). Second, since a significant fraction of 5-CF transferred from the intestine to the germline, we conclude that small membrane-impermeable molecules produced in the intestine can reach the germline and influence its activities. Third, since we did not detect obvious fluorescence in other tissues of the animal, including the body wall muscles, hypodermis, coelomocytes and nervous system, this intestine to germline small membrane-impermeable molecule transfer may expose a specific signaling axis between these two tissues.

5-CF does not transfer through intact membranes

We designed several controls to ensure that 5-CF was indeed membrane-impermeable, and that the diffusion pattern that we observed did not occur due to membrane disruptions during manipulations. First, we microinjected another membrane-impermeable fluorescent molecule that is too large to pass through gap junctions, the green fluorescent protein (GFP), which has a relatively high molecular weight of 27 kDa. As expected, GFP microinjected in the intestine remained restricted within the few intestinal cells around the injection site whose separating membranes likely burst by the injection blow, and it did not diffuse into farther intestinal cells, nor into any other tissues of the animal (Fig 2A, A'). This also shows that the whole left after the microinjection is immediately sealed as the microneedle is removed, and that the procedure does not lead to any significant leakage.

Next, we used a cell-permeable fluorescent dye, Hoechst, to rule out the possibility that 5-CF could have generated such a pattern by diffusing through cell membranes. Hoechst freely passes through membranes but does not freely diffuse due to its high affinity for chromatin (ThermoFisher Scientific 2006-2023). We therefore opted for feeding it to animals rather than microinjecting a small quantity in the intestine, since it would have probably only stained a few nuclei around the injection site. When we soaked animals into Hoechst, high quantities of the dye penetrated the animal's intestine and stained all intestinal nuclei, while a vast excess of stain passed through the intestine and from there, stained every nuclei within the animal (Fig 2B-B'). This result indicates that there are no membrane-independent diffusion barriers between the intestine and the other tissues of the animal.

As an additional control, we soaked animals in a saturated 5-CF solution to verify that this dye would not pass through the intestine luminal membrane, which lacks gap junction hemmichannels(Zhang, Khan et al. 2017). After an hour of soaking, followed by a 30 minute recovery period in the absence of dye, animals did not retain any obvious fluorescence apart from within head amphid neurons (Fig 2C-C'), which are open to the environment(Lanjuin and Sengupta 2004). Overall, we conclude that 5-CF cannot pass directly through cell membranes, and that based of the observed diffusion pattern after its microinjection in the animal's intestine (Fig. 1), some of it transfers to the germline through an unknown route.

Small variations in the intestinal microinjection site do not affect 5-CF transfer to the germline

Before moving into further quantitative comparisons of the 5-CF diffusion pattern, we first verified that small variations in the microinjection site would not dramatically impact the spread of 5-CF from the intestine to the germline. To this end, we injected 5-CF in the intestine of wild type adult hermaphrodite, either just anterior or just posterior to the vulva, into the int4/int5 or int5/int6 pair, respectively. After the recovery period, total fluorescence intensity across the entire intestine's length was measured in each group. The data were doubly normalized to compensate for differences in intestinal length between individuals, and in the quantity of dye injected (Fig.3A). For quantification purposes, the intestine was then longitudinally divided into five equal zones, the third zone always encompassing the injection site. There was a slight but significant bias in dye distribution, as animals that were injected just anterior to the vulva, had more dye within the anterior intestinal regions and inversely, the dye preferentially accumulated in the posterior intestine of animals that were injected just posterior to the vulva (Fig. 3B).

We then asked whether these small differences in dye distribution within the intestine could influence the transfer of 5-CF from the intestine to the anterior and posterior gonadal arm regions. However, we did not find any significant differences in the transfer of 5-CF to the anterior vs posterior germline regions, whether animals were injected in the intestine just anterior or just posterior to the vulva (Fig. 3C-H). Overall, these results show that small variations in the intestinal injection site around the vulva, despite that they slightly affect intra-intestinal dye distribution, do not significantly impact dye transfer to the germline.

5-CF diffusion to the distal germline is independent from RME-2-mediated endocytosis

For all intestinal microinjections, we noticed a higher concentration of 5-CF transferring into in the oocytes and eggs relative to the pachytene region (Fig. 1). Several factors could explain this phenomenon, including the presence of distal-to-proximal cytoplasmic streaming within the gonad arms(Wolke, Jezuit et al. 2007), or potential

differences in gap junction abundance, size and/or in gating regulation between these regions. However, the exo/endocytosis pathway is also known to transport yolk proteins from the intestine to the maturing oocytes (Grant and Hirsh 1999). Indeed, yolk proteins are synthesized in the intestine, secreted into the pseudocoelom and endocytosed by oocytes through the yolk receptor RME-2, an LDL receptor-like molecule specifically expressed by oocytes (Grant and Hirsh 1999). We therefore asked whether a fraction of the 5-CF that transferred from the intestine to the oocytes, travelled along with the yolk proteins. To evaluate this potential contribution, we micro-injected 5-CF in the intestine of *rme-2(b1008)* mutants and monitored its transfer to the germline. We observed a drastic reduction in the transfer of 5-CF from the intestine to the oocytes and distal eggs in *rme-2(b1008)* mutants, meaning that the major fraction of 5-CF uses this exo/endocytic route to travel from the intestine to the proximal germline (Fig. 4A-G). However, comparable 5-CF concentrations reached the germline pachytene region in wild type and *rme-2(b1008)* mutants (Fig. 4H-I). We also note that a small fraction of 5-CF, comparable to the fraction that transferred to the pachytene region in wild-type or *rme-2(b1008)* mutants, still transferred to the oocytes and eggs in *rme-2(b1008)* mutants (Fig. 4 D-G). We therefore conclude that a large proportion of 5-CF transfers from the intestine to the oocytes via exo/endocytosis and the RME-2 yolk receptor, but that a smaller yet significant part gets into the germline through another unknown route.

5-CF also transfers from the germline to the intestine

Next, we carried out the reverse experiment and asked whether 5-CF microinjected in the germline pachytene region would remain within that gonad arm, or transfer to the intestine and/or other tissues of the animal. Such “retrograde” transfer was not necessarily expected as for example, the yolk exo/endocytosis route is widely viewed as being unidirectional (Grant and Hirsh 1999, Kern, Townsend et al. 2021, Zhai, Zhang et al. 2022). Yet, when we microinjected 5-CF in the anterior gonad arm’s pachytene region, the dye transferred into the intestine and visibly spread over its whole length (Fig. 5A-B). Quite strikingly, the dye was also detectable in the posterior gonad arm’s pachytene region, proximal-most oocytes, and distal-most eggs (Fig. 5A-B, D-J). The same phenomenon occurred following injection in the posterior arm, although we did not inject enough animals to quantify it (Fig. 5C). Since there were no apparent dye in the other tissues, including the uterus, we suspect that the dye transferred from the injected gonad arm to the pseudocoelom and intestine, and from here and/or there, into the uninjected gonad arm.

We noticed that for both intestinal and distal germline microinjections the dye fluorescence intensity did not equalize between the two tissues, despite allowing ample time to diffuse, and remained more concentrated in the recipient tissue (Figs. 1, 5). By measuring the fluorescence transfer ratios, we found that similar relative fluorescence intensities were attained in the distant tissue, regardless of whether the dye was injected in the intestine or germline pachytene (Fig 5K). Altogether, these results establish the bi-directional small membrane-impermeable molecule transfer between the *C. elegans*

intestine and germline. The results further imply the existence of a bi-directional partial diffusion barrier slowing down 5-CF transfer between the two tissues, since only a small proportion of it reaches the distant tissue. For the same reason, they also formally exclude the possibility that the intestine and germline are directly, or indirectly via the somatic gonad, connected by gap-junctions.

Intestine to distal germline 5-CF transfer efficiency does not vary together with GSC proliferation rates

To determine whether gap junction gating, by modulating the transfer of small molecules between the somatic gonad and the germline, could underlie the regulation of GSC proliferation rates, we microinjected 5-CF in the gut of different mutants in which GSC proliferation is known to be reduced. We first monitored 5-CF diffusion in insulin-like receptor *daf-2* mutants in which GSC proliferation is reduced due to lack of growth factor stimulation downstream of nutrient uptake (Narbonne and Roy 2006, Michaelson, Korta et al. 2010, Narbonne, Maddox et al. 2015). This reduction in proliferation requires the activity of both DAF-18/PTEN and DAF-16/FOXO (Narbonne and Roy 2006, Michaelson, Korta et al. 2010, Narbonne, Maddox et al. 2015). We did not however detect any differences in the efficiency of 5-CF transfer from the intestine to the germline pachytene region between any of the tested mutant combinations in this pathway (Fig. 6A-G). There was however a significant reduction of 5-CF transfer from the intestine to the oocytes and eggs in *daf-2* mutants (Fig. 6H-K). This is likely linked to the slower rates of oocyte maturation and reduced vitellogenesis of these mutants (Lopez, Chen et al. 2013) (DePina, Iser et al. 2011), which is the main route of dye transfer from the intestine to the oocytes (Fig. 4). Because similar proportions of 5-CF still transferred from the intestine to the distal germline in these *daf-2* mutants that have reduced GSC proliferation, we infer that this reduction in proliferation does not involve the instauration of any further restrictions to the transfer of small molecules to the distal germline, such as one that could have been imposed by somatic gonad or germline gap junction closure.

In parallel to IIS, somatic MPK-1 activity non-autonomously promotes GSC proliferation (Lee, Ohmachi et al. 2007, Robinson-Thiewes, Dufour et al. 2021). MPK-1 signaling is however reduced in germline-feminized *fog-1(ø)* mutants, which lack sperm and have reduced oocyte needs, through a homeostatic feedback loop requiring AAK-1/AMPK activity (Miller, Nguyen et al. 2001, Morgan, Crittenden et al. 2010, Narbonne, Maddox et al. 2015, Cinquin, Chiang et al. 2016, Narbonne, Maddox et al. 2017). We therefore asked whether the reduced GSC proliferation rates of *fog-1(ø)* and *mpk-1(ø)* mutants could be associated with a restriction in the transfer of small membrane-impermeable molecules from the intestine to the germline. Yet, again we did not detect any differences in the transfer of 5-CF from the intestine to the germline pachytene area between any of the tested genotypes and the wild type (Fig. 7A-E). However, there was a significant reduction of 5-CF transfer from the intestine to the oocytes in *fog-1(ø)* mutants, which was suppressed by *aak-1(ø)* (Fig. 7F-G). This may reflect a reduction in yolk

transport when sperm is depleted, and oocytes arrest and accumulate (Sornda, Ezcurra et al. 2019), as dye transfer reverted to normal when the *aak-1(ø)* mutation was added to prevent oocyte arrest and accumulation (Narbonne, Maddox et al. 2017). We therefore conclude that the downregulation of GSC proliferation that occurs when *mpk-1* signaling is reduced does not significantly restrict 5-CF transfer from the intestine to the distal germline. As such, the closure of gap junctions cannot explain the reduced GSC proliferation rates that characterize *mpk-1(ø)* mutants, nor can it underlie homeostatic downregulation of GSC proliferation.

Discussion

In this study, we investigated the distribution of the small membrane-impermeable green fluorescent dye 5-CF following its microinjection in the *C. elegans* intestine and germline. We found that intestine-injected 5-CF diffused away from injected cells and spread through the whole intestine. A fraction of the dye also transferred from the intestine to the germline, while we did not observe any obvious accumulation elsewhere in the animal. The larger part of the intestine to germline dye transfer occurred via the exo/endocytosis route, requiring the RME-2 yolk receptor. As such, intestine-injected 5-CF abundantly labelled proximal-most oocytes, some of which turned into eggs during the recovery period. Significant 5-CF amounts however transferred to the germline, including the pachytene region, independently of RME-2, and thus must have used another route. 5-CF being membrane-impermeable, but small enough to pass through gap junctions, this route may include the gap junctions that link the somatic gonad to the germline, but it remains unclear how the dye “jumped” from the intestine to the somatic gonad since gap junctions have not been reported between these two tissues, which are separated by the pseudocoelomic space (Hall, Winfrey et al. 1999, Hall 2018).

Several controls were performed to strengthen this paradox-creating conclusion. We microinjected GFP, a molecule that is too large to pass through gap junctions. As expected, GFP could not escape from the cells that were targeted by the injection, indicating that there are no membrane-free gaps between the intestine and the germline. Next, we fed animals Hoechst, a cell-permeable fluorescent dye. Here, the dye did diffuse from the intestine to the germline, its concentration visibly equalizing in both tissues, while the dye also transferred to all the other tissues of the animal. This revealed that there were no membrane-independent diffusion barriers in the animal, and that cell membranes participate in the apparent specificity of this small molecule exchange between the intestine and germline. Then, we soaked animals in a saturated 5-CF solution to confirm that this dye could not pass through membranes that lack gap junctions, such as the intestine luminal membrane. Finally, and perhaps most convincingly, we microinjected the dye in the germline pachytene region, in both gonad arm, and showed that the transfer occurred in both directions, as it could now accumulate in the animal’s intestine. Our results therefore establish strong grounds for the existence of bidirectional small membrane-impermeable molecule mediated soma-germline interactions. As such, this intestine to germline axis of

signaling may not only serve to promote germline functions such as GSC proliferation and oocyte maturation/ovulation(Starich, Hall et al. 2014, Hubbard and Schedl 2019, Robinson-Thiewes, Dufour et al. 2021), but perhaps also influence somatic outcomes such as aging, in response to germline cues. For example, germline ablation is well-known to considerably extend lifespan(Hsin and Kenyon 1999). Small life shortening membrane-impermeable molecules could therefore emanate from the growing germline and directly affect the animal's intestine, which is largely implicated in lifespan regulation (Uno and Nishida 2016, Hodge, Bajuszova et al. 2022).

Previous work has uncovered a couple of long-distance intestine-to-germline interactions in *C. elegans*. In one example, cytidine deaminases were found to be required in the gut **or** somatic gonad of the animal to non-autonomously promote GSC proliferation. In this case, it was concluded that low uridine/thymidine (the product of these enzymes) in the gut **and** somatic gonad suppressed GLP-1/Notch signaling and reduced GSC proliferation(Chi, Ronai et al. 2016). In the second example, we found that MPK-1/ERK activity was required, again either in the animal's intestine **or** somatic gonad, to promote GSC proliferation(Robinson-Thiewes, Dufour et al. 2021). This current piece now demonstrates that small membrane-impermeable molecules, such as uridine and thymidine, can effectively transfer from the intestine to the germline, most likely via the somatic gonad. This legitimizes the hypothesis that cytidine deaminase and MPK-1 may promote germline proliferation via the production of small metabolites in either the intestine or the somatic gonad; independently of the tissue in which they are produced, since the metabolites can transfer from either tissue to the germline to promote proliferation. As such, the intestine and germline tissues may share many small membrane impermeable molecules such as ions, second messengers and small metabolites implicated in a number of biological processes.

Upon injection of 5-CF in the *C. elegans* intestine, and despite some small biases linked to the microinjection site, we noticed that the dye concentration roughly equalized throughout the length of the gut (Fig. 3). This was expected due to the presence of gap junctions coupling all cells together within this tissue(Hall 2018). We noticed that a fraction of the dye reached the germline, a large part of which employed the exo/endocytosis RME-2 route, the passageway that conveys the yolk proteins from the intestine to the oocytes, to reach the proximal germline. The exact route employed by the remaining smaller fraction of the dye to travel from the intestine to the germline however remains obscure. Yet, this route must allow bidirectional exchanges as a similar proportion of the dye transferred from the germline to the intestine. The intestine is separated from the somatic gonad and germline by a space containing interstitial fluid: the pseudocoelom(Hall 2018). Interestingly, when GFP is secreted into the pseudocoelom from any tissue, it is predominantly taken up by 6 coelomocytes, scavenger cells that non-specifically endocytose pseudocoelomic fluid(Fitzgerald and Greenwald 1995, Grant and Greenwald 1997, Fares and Greenwald 2001). In a pioneering piece Fares and Greenwald microinjected several other dyes in the pseudocoelomic space to investigate endocytosis by the animal's coelomocytes. Interestingly, among the small molecules tested, only the

dyes that appeared to adhere to yolk granules were not efficiently endocytosed by the coelomocytes, and ended up in the oocytes (Fares and Greenwald 2001). Based on these early observations, it is possible that 5-CF adhered to the yolk granules and was secreted from the intestine into the pseudocoelom via exocytosis along with the yolk. This would explain why a large fraction of it was endocytosed by oocytes via their RME-2 receptors. If 5-CF indeed adheres to yolk granules, another yet to be identified, and more widely expressed but less prominent, yolk receptor could then be responsible for the uptake of the remaining fraction of the dye throughout the germline. Yet, this would still not explain the transfer that occurred in the other direction, from the germline to the intestine, as yolk transport is believed to occur unidirectionally from the intestine to the germline (Grant and Hirsh 1999, Kern, Townsend et al. 2021, Zhai, Zhang et al. 2022). Several alternative routes are possible for this transfer of small membrane-impermeable molecules, such as those implicated in the inter-tissue transfer of RNA molecules (Winston, Molodowitch et al. 2002, Feinberg and Hunter 2003) or nucleosides (Appleford, Griffiths et al. 2004). Finally, 5-CF could also mix in with the range of small molecules that are packed into the microvesicles and exosomes that are released by many cell types, including the *C. elegans* intestine (Russell, Kim et al. 2020). Deeper investigations will however be required to identify the exact mechanism(s) underlying the reciprocal RME-2-independent exchange of 5-CF between the intestine and germline.

We finally aimed to analyze the distribution of 5-CF across different genotypes. Before conducting the analysis, we verified that small variations in the microinjection site did not widely affect the transfer of 5-CF from the intestine to the germline. Although the dye preferentially accumulated within the anterior half of the intestine in animals injected just anterior to the vulva and in the posterior half when injected just posterior to the vulva, this small difference in dye distribution within the intestine did not significantly impact transfer of 5-CF to the germline. As such, we could investigate whether restrictions in the intestine-to-germline transfer of small membrane-impermeable molecules could underlie the downregulation of GSC proliferation rates that occurs in insulin/IGF-1 and MPK-1 pathway mutants. We found that the efficiency of 5-CF transfer from the intestine to the germline pachytene region remained stable across all tested genetic backgrounds, regardless of their rates of GSC proliferation. 5-CF transfer to oocytes (and eggs) was however reduced in both *daf-2* and *fog-1* mutants (Figs. 6-7). Consistent with these results, *daf-2* mutants were reported to have reduced vitellogenesis and yolk transport from intestine to oocytes (Evans, Chen et al. 2008, DePina, Iser et al. 2011, Ezcurra, Benedetto et al. 2018). Reduced IIS however did not reduce the efficiency of 5-CF transfer to the distal part of the germline, suggesting that it downregulates GSC proliferation without influencing the transfer of small membrane-impermeable molecules to this part of the germline. Similarly, the inactivation of MPK-1/ERK signaling, either through a null *mpk-1* mutation or through its homeostatic downregulation by germline feminization, did not modify the pattern of 5-CF transfer from the intestine to the distal germline (we could not test diffusion to the oocytes in *mpk-1(ø)* as germ cells arrest at the late pachytene stage in this background (Lee, Ohmachi et al. 2007)). Together, our results establish the possibility that MPK-1 activity in the intestine or somatic gonad could generate small membrane-

impermeable molecules that could transfer from either of these tissues to the germline, where they would promote GSC proliferation. At the same time, our work also represses the idea that regulation of GSC proliferation rates could occur at the level of small molecule transfer control, including by somatic gonad or germline gap junction gating.

Soma-germline interactions occur in many other organisms and the disruption of these interactions perturbs several aspects of germ cell development and function, which can have significant implications on reproductive success, but also on the health and survival of the organism (McCarter, Bartlett et al. 1997, Starich, Hall et al. 2014, Starich and Greenstein 2020, Starich, Bai et al. 2020). Unraveling the molecular mechanisms underlying soma-germline interactions may therefore lead to the development of new therapeutic strategies related to germline dysfunction, but perhaps also towards healthy aging. More broadly, the transfer of small membrane-impermeable molecules across tissues may be implicated in a range of developmental and intercellular signaling processes, and thus its deregulation could equally underlie several pathologies, including those implicating stem cell proliferation defects, such as many degenerative diseases and cancers.

Experimental procedures

Strains

Animals were maintained on standard NGM plates and fed *E. coli* bacteria of the strain OP50 (Brenner 1974). The Bristol isolate (N2) was used as wild type throughout. Prior to all assays, animals were grown at 15°C, and based on vulva development (Seydoux, Savage et al. 1993), were transferred at the late L4-stage to a new plate at 25°C, for an additional 24 hours before any subsequent treatment. We use “A1” to refer to these day-1 adults (Narbonne, Maddox et al. 2015). The following alleles and transgenes were used. LGI: *fog-1(q785)*, *daf-16(mu86)*. LGII: *cpSi20[Pmex-5::TAGRFPT::PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)]*. LGIII: *daf-2(e1370)*, *aak-1(tm1944)*, *mpk-1(gal117)*. LGIV: *daf-18(nr2037)*, *rme-2(b1008)*. The following rearrangements were used. *qC1[dpy-19(e1259) glp-1(q339) qIs26[rol-6(su1006)gf; Plag-2::GFP]]*III, *hT2[bli-4(e937) let-?(q782) qIs48](I;III)*.

Microinjection

A1 hermaphrodites were microinjected either in the intestine (dorsally, either just anterior or just posterior to the vulva) or distal gonad (pachytene region) with a small volume (estimated at 30-50 pl) (Mello, Kramer et al. 1991) of 1x PBS saturated with 5-CF (MilliporeSigma #86826) or 1mg/ml GFP (Abcam #ab84191), using techniques previously described (Mello, Kramer et al. 1991). Briefly, animals were picked into a drop of halocarbon oil, and immobilized by sticking them against a dried agarose pad on a cover slip. We used an Eppendorf InjectMan4 micromanipulator coupled to an inverted Zeiss Axiovert A1 equipped with a 63x dry objective (NA 0.85) for all microinjections. Animals never stayed more than two minutes on the injection pad, and after the injection, they were allowed to recover on a seeded plate for one hour at room temperature. This time easily

allowed the 5-CF to diffuse throughout length of the animal (Fig. 1B). Animals that did not entirely recover from the microinjection procedure were discarded.

Staining

A1 hermaphrodites were harvested from plates in 1 ml of M9 buffer. The suspension was pipetted into a 1.5ml microtube and centrifuged at 2500 rpm for 1 minute. The supernatant was removed to leave worms in about 20 μ l of M9 buffer. 50 μ l of either a saturated 5-CF or of 18mM Hoescht (ThermoFisher, H3570) was mixed into the microtube. Animals were stained on a shaker plate at 80 rpm for 1 hour in the dark. After the incubation time, worms were pipetted on a seeded plate for 30 minutes to recover and allow the complete clearing of the stain from their intestinal lumen, before they were imaged.

Image acquisition

For imaging, A1 animals were paralysed by soaking in a 0.1% Tetramizole (Sigma, L9756) M9 solution for five minutes and mounted on a 3% agarose pad. Differential interference contrast (DIC) and epifluorescence images were acquired every micron using a Plan-Apochromat 20x dry objective (NA 0.8) mounted on an inverted Zeiss Axio Observer.Z1. Images were stitched using the Zen 2.6 software and animals were computationally straightened using ImageJ. All DIC images show single focal planes, while fluorescence images show maximal projections. The overlay images in Fig. 1E-H however, were realized with single fluorescent focal planes to represent how the analysis was realized. The exact same acquisition parameters were used for all samples within each assay, but could vary between separate assays.

Fluorescence quantification

Fluorescence quantification was performed using ImageJ. To quantify 5-CF diffusion between the intestine and the different germline regions, or from the germline pachytene region to the intestine, we first measured the whole animal's total fluorescence intensity for each subject. We used the average value for all wild type injections to normalize the fluorescence intensities obtained for the other genotypes, and for individuals within each genotypes, in order to compensate for variations in the quantity of fluorochrome injected. We then placed three identical circular ROIs of 99,451 μ m² and averaged their fluorescence intensities in the focal plane where the middle of the following tissues was in focus: intestine, anterior and posterior germline pachytene regions, proximal-most (-1) oocytes, and distal-most (+1) eggs. Fluorescence intensity values for each region were normalised based on the total fluorescence intensity in the whole animal and were background subtracted to remove the signal coming from natural autofluorescence using the respective regions of uninjected controls of the same genotype. For all fluorescence intensity graphs except Fig. 1C, this average endogenous fluorescence was subtracted from all samples, including uninjected controls, such that the fluorescence intensity values for injected animals are directly proportional to fluorophore concentrations.

For the quantification of 5-CF along the length of the intestine in Fig. 3A-B, an 80-pixel wide segmented line was manually drawn over the length of the intestine and selected as the region of interest (ROI). Average pixels intensities at each x -coordinate within the ROI were obtained using the Plot Profile tool. To normalize for intestine length, each x -coordinate from the plot profile line was divided by the length of the line and all pixel intensities were pooled by integer from 1 to 100 at a 0,01 span. We then used uninjected controls to subtract the background autofluorescence from all images. To normalize for variations in microinjection volumes, all pixel intensity values (y-coordinates) were divided by the animal's intestine length normalized total pixel intensity. Finally, the adjusted (length-normalized, background subtracted and intensity-normalized) fluorescence intensities were averaged for each group. For Fig. 3A-B, the intestine was longitudinally divided into five equal zones, and all y-coordinates were averaged within each zone for Fig. 3B. The third zone, located at the middle of the gut, always comprised the injection site.

Statistical analysis

Details of the statistical analyses are indicated in figure legends. The one-way ANOVA and Tukey's post-hoc tests were used to evaluate statistical significance among multiple groups. A two-tailed t-test assuming equal variance was performed when comparing only two groups. P values lower than 0.05 were considered as statistically significant.

Acknowledgements

We thank Matthieu Valet for helping in the establishment of mathematical formulas that made the analysis easier. We thank Wormbase and the *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC) for their invaluable role in supporting *C. elegans* research. The CGC is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440).

Author contributions

STC: Conceptualization, Methodology, Investigation, Experimentation, Formal analysis, Visualization, Writing – original draft,.

LB: Conceptualization, Methodology, Investigation.

POM: Validation, Methodology.

PN: Conceptualization, Methodology, Investigation (microinjections), Writing – original draft, review and editing, Supervision, Funding acquisition.

Funding and additional information

Research in the Narbonne Laboratory is funded by grants from the NSERC (RGPIN-2019-06863, RGPAS-2019-00017, DGEGR-2019-00326) and the CIHR (PJT-169138) to PN. PN is an FRQ-S Junior 2 Bursary Scholar (310643). S.T-C. was supported by the Fédération de la Chambre des Commerce du Québec (FCCQ) internship program *Accueillez un stagiaire*.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- 1 Mittelbrunn, M. & Sánchez-Madrid, F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 328-335 (2012). <https://doi.org:10.1038/nrm3335>
- 2 Francis, K. & Palsson, B. O. Effective intercellular communication distances are determined by the relative time constants for cyto/chemokine secretion and diffusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12258-12262 (1997). <https://doi.org:10.1073/pnas.94.23.12258>
- 3 Laird, D. W. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* **394**, 527-543 (2006). <https://doi.org:10.1042/BJ20051922>
- 4 Mesnil, M., Crespin, S., Avanzo, J. L. & Zaidan-Dagli, M. L. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* **1719**, 125-145 (2005). <https://doi.org:10.1016/j.bbame.2005.11.004>
- 5 Sinyuk, M., Mulkearns-Hubert, E. E., Reizes, O. & Lathia, J. Cancer Connectors: Connexins, Gap Junctions, and Communication. *Front Oncol* **8**, 646 (2018). <https://doi.org:10.3389/fonc.2018.00646>
- 6 Harris, A. L. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys* **34**, 325-472 (2001). <https://doi.org:10.1017/s0033583501003705>
- 7 Oshima, A., Matsuzawa, T., Murata, K., Tani, K. & Fujiyoshi, Y. Hexadecameric structure of an invertebrate gap junction channel. *Journal of Molecular Biology* **428**, 1227-1236 (2016). <https://doi.org:https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.011>
- 8 Panchin, Y. *et al.* A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol* **10**, R473-474 (2000). [https://doi.org:10.1016/s0960-9822\(00\)00576-5](https://doi.org:10.1016/s0960-9822(00)00576-5)
- 9 Skerrett, I. M. & Williams, J. B. A structural and functional comparison of gap junction channels composed of connexins and innexins. *Dev Neurobiol* **77**, 522-547 (2017). <https://doi.org:10.1002/dneu.22447>

- 10 Oshima, A., Matsuzawa, T., Nishikawa, K. & Fujiyoshi, Y. Oligomeric structure and functional characterization of *Caenorhabditis elegans* Innexin-6 gap junction protein. *J Biol Chem* **288**, 10513-10521 (2013). <https://doi.org:10.1074/jbc.M112.428383>
- 11 Beyer, E. C. & Berthoud, V. M. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1860**, 5-8 (2018). <https://doi.org:10.1016/j.bbamem.2017.05.016>
- 12 Depriest, A., Phelan, P. & Martha Skerrett, I. Tryptophan scanning mutagenesis of the first transmembrane domain of the innexin Shaking-B(Lethal). *Biophys J* **101**, 2408-2416 (2011). <https://doi.org:10.1016/j.bpj.2011.10.004>
- 13 Oshima, A., Tani, K., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y. & Sosinsky, G. E. Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10034-10039 (2007). <https://doi.org:10.1073/pnas.0703704104>
- 14 Phelan, P. & Starich, T. A. Innexins get into the gap. *Bioessays* **23**, 388-396 (2001). <https://doi.org:10.1002/bies.1057>
- 15 Phelan, P. Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. *Biochim Biophys Acta* **1711**, 225-245 (2005). <https://doi.org:10.1016/j.bbamem.2004.10.004>
- 16 Yen, M. R. & Saier, M. H., Jr. Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily. *Prog Biophys Mol Biol* **94**, 5-14 (2007). <https://doi.org:10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.006>
- 17 Bauer, R. *et al.* Intercellular communication: the *Drosophila* innexin multiprotein family of gap junction proteins. *Chem Biol* **12**, 515-526 (2005). <https://doi.org:10.1016/j.chembiol.2005.02.013>
- 18 Simonsen, K. T., Moerman, D. G. & Naus, C. C. Gap junctions in *C. elegans*. *Front Physiol* **5**, 40 (2014). <https://doi.org:10.3389/fphys.2014.00040>
- 19 Saez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martinez, A. D. & Beyer, E. C. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* **83**, 1359-1400 (2003). <https://doi.org:10.1152/physrev.00007.2003>
- 20 Peracchia, C. Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochim Biophys Acta* **1662**, 61-80 (2004). <https://doi.org:10.1016/j.bbamem.2003.10.020>
- 21 Hertzberg, E. L., Lawrence, T. S. & Gilula, N. B. Gap junctional communication. *Annu Rev Physiol* **43**, 479-491 (1981). <https://doi.org:10.1146/annurev.ph.43.030181.002403>
- 22 Peracchia, C., Wang, X. G. & Peracchia, L. L. Chemical gating of gap junction channels. *Methods* **20**, 188-195 (2000). <https://doi.org:10.1006/meth.1999.0936>
- 23 Kwon, T. *et al.* Molecular dynamics simulations of the Cx26 hemichannel: insights into voltage-dependent loop-gating. *Biophys J* **102**, 1341-1351 (2012). <https://doi.org:10.1016/j.bpj.2012.02.009>
- 24 Goodenough, D. A., Goliger, J. A. & Paul, D. L. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* **65**, 475-502 (1996). <https://doi.org:10.1146/annurev.bi.65.070196.002355>
- 25 Leithe, E., Mesnil, M. & Aasen, T. The connexin 43 C-terminus: A tail of many tales. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1860**, 48-64 (2018). <https://doi.org:10.1016/j.bbamem.2017.05.008>
- 26 Dunn, C. A., Su, V., Lau, A. F. & Lampe, P. D. Activation of Akt, not connexin 43 protein ubiquitination, regulates gap junction stability. *J Biol Chem* **287**, 2600-2607 (2012). <https://doi.org:10.1074/jbc.M111.276261>

- 27 Remo, B. F. *et al.* Phosphatase-resistant gap junctions inhibit pathological remodeling and prevent arrhythmias. *Circ Res* **108**, 1459-1466 (2011). <https://doi.org:10.1161/circresaha.111.244046>
- 28 Locke, D., Bian, S., Li, H. & Harris, A. L. Post-translational modifications of connexin26 revealed by mass spectrometry. *Biochem J* **424**, 385-398 (2009). <https://doi.org:10.1042/bj20091140>
- 29 Aasen, T., Johnstone, S., Vidal-Brime, L., Lynn, K. S. & Koval, M. Connexins: Synthesis, Post-Translational Modifications, and Trafficking in Health and Disease. *Int J Mol Sci* **19** (2018). <https://doi.org:10.3390/ijms19051296>
- 30 Kanno, S. & Saffitz, J. E. The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Pathol* **10**, 169-177 (2001). [https://doi.org:10.1016/s1054-8807\(01\)00078-3](https://doi.org:10.1016/s1054-8807(01)00078-3)
- 31 Schulz, C., Wood, C. G., Jones, D. L., Tazuke, S. I. & Fuller, M. T. Signaling from germ cells mediated by the rhomboid homolog *stet* organizes encapsulation by somatic support cells. *Development* **129**, 4523-4534 (2002). <https://doi.org:10.1242/dev.129.19.4523>
- 32 Jemc, J. C. Somatic gonadal cells: The supporting cast for the germline. *genesis* **49**, 753-775 (2011). <https://doi.org:https://doi.org/10.1002/dvg.20784>
- 33 Pesch, Y. Y. *et al.* Gap junctions mediate discrete regulatory steps during fly spermatogenesis. *PLoS Genet* **18**, e1010417 (2022). <https://doi.org:10.1371/journal.pgen.1010417>
- 34 Smendziuk, C. M., Messenberg, A., Vogl, A. W. & Tanentzapf, G. Bi-directional gap junction-mediated soma-germline communication is essential for spermatogenesis. *Development* **142**, 2598-2609 (2015). <https://doi.org:10.1242/dev.123448>
- 35 Simon, A. M., Goodenough, D. A., Li, E. & Paul, D. L. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* **385**, 525-529 (1997). <https://doi.org:10.1038/385525a0>
- 36 Byrd, D. T. & Kimble, J. Scratching the niche that controls *Caenorhabditis elegans* germline stem cells. *Semin Cell Dev Biol* **20**, 1107-1113 (2009). <https://doi.org:10.1016/j.semcdb.2009.09.005>
- 37 Kimble, J. E. & White, J. G. On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **81**, 208-219 (1981).
- 38 Kimble, J. & Crittenden, S. L. Germline proliferation and its control. *WormBook*, 1-14 (2005). <https://doi.org:10.1895/wormbook.1.13.1>
- 39 Hubbard, E. J. A. & Schedl, T. Biology of the *Caenorhabditis elegans* Germline Stem Cell System. *Genetics* **213**, 1145-1188 (2019). <https://doi.org:10.1534/genetics.119.300238>
- 40 Byrd, D. T., Knobel, K., Affeldt, K., Crittenden, S. L. & Kimble, J. A DTC niche plexus surrounds the germline stem cell pool in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* **9**, e88372 (2014). <https://doi.org:10.1371/journal.pone.0088372>
- 41 Crittenden, S. L., Leonhard, K. A., Byrd, D. T. & Kimble, J. Cellular analyses of the mitotic region in the *Caenorhabditis elegans* adult germ line. *Mol Biol Cell* **17**, 3051-3061 (2006). <https://doi.org:10.1091/mbc.E06-03-0170>
- 42 McCarter, J., Bartlett, B., Dang, T. & Schedl, T. Soma-germ cell interactions in *Caenorhabditis elegans*: multiple events of hermaphrodite germline development require the somatic sheath and spermathecal lineages. *Dev Biol* **181**, 121-143 (1997). <https://doi.org:10.1006/dbio.1996.8429>
- 43 Hall, D. H. *et al.* Ultrastructural features of the adult hermaphrodite gonad of *Caenorhabditis elegans*: relations between the germ line and soma. *Dev Biol* **212**, 101-123 (1999). <https://doi.org:10.1006/dbio.1999.9356>

- 44 Crittenden, S. L. *et al.* Regulation of the mitosis/meiosis decision in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 1359-1362 (2003). <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1333>
- 45 Nadarajan, S., Govindan, J. A., McGovern, M., Hubbard, E. J. & Greenstein, D. MSP and GLP-1/Notch signaling coordinately regulate actomyosin-dependent cytoplasmic streaming and oocyte growth in *C. elegans*. *Development* **136**, 2223-2234 (2009). <https://doi.org/10.1242/dev.034603>
- 46 Starich, T. A., Hall, D. H. & Greenstein, D. Two classes of gap junction channels mediate soma-germline interactions essential for germline proliferation and gametogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **198**, 1127-1153 (2014). <https://doi.org/10.1534/genetics.114.168815>
- 47 Hall, D. H. Gap junctions in *C. elegans*: Their roles in behavior and development. *Dev Neurobiol* **77**, 587-596 (2017). <https://doi.org/10.1002/dneu.22408>
- 48 Michaelson, D., Korta, D. Z., Capua, Y. & Hubbard, E. J. Insulin signaling promotes germline proliferation in *C. elegans*. *Development* **137**, 671-680 (2010). <https://doi.org/10.1242/dev.042523>
- 49 Narbonne, P. & Roy, R. Regulation of germline stem cell proliferation downstream of nutrient sensing. *Cell Div* **1**, 29 (2006). <https://doi.org/10.1186/1747-1028-1-29>
- 50 Narbonne, P., Maddox, P. S. & Labbe, J. C. DAF-18/PTEN locally antagonizes insulin signalling to couple germline stem cell proliferation to oocyte needs in *C. elegans*. *Development* **142**, 4230-4241 (2015). <https://doi.org/10.1242/dev.130252>
- 51 Narbonne, P., Maddox, P. S. & Labbe, J. C. DAF-18/PTEN signals through AAK-1/AMPK to inhibit MPK-1/MAPK in feedback control of germline stem cell proliferation. *PLoS Genet* **13**, e1006738 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006738>
- 52 Drummond-Barbosa, D. & Spradling, A. C. Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. *Dev Biol* **231**, 265-278 (2001). <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0135>
- 53 Robinson-Thiewes, S. *et al.* Non-autonomous regulation of germline stem cell proliferation by somatic MPK-1/MAPK activity in *C. elegans*. *Cell Rep* **35**, 109162 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109162>
- 54 Lastwika, K. J., Dunn, C. A., Solan, J. L. & Lampe, P. D. Phosphorylation of connexin 43 at MAPK, PKC or CK1 sites each distinctly alter the kinetics of epidermal wound repair. *J Cell Sci* **132** (2019). <https://doi.org/10.1242/jcs.234633>
- 55 Peters, M. A., Teramoto, T., White, J. Q., Iwasaki, K. & Jorgensen, E. M. A calcium wave mediated by gap junctions coordinates a rhythmic behavior in *C. elegans*. *Curr Biol* **17**, 1601-1608 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.031>
- 56 Altun, Z. F., Chen, B., Wang, Z. W. & Hall, D. H. High resolution map of *Caenorhabditis elegans* gap junction proteins. *Dev Dyn* **238**, 1936-1950 (2009). <https://doi.org/10.1002/dvdy.22025>
- 57 Bossinger, O. & Schierenberg, E. The use of fluorescent marker dyes for studying intercellular communication in nematode embryos. *Int J Dev Biol* **40**, 431-439 (1996).
- 58 *Detection of Bacteria, Viruses, Parasites and Fungi*. (Springer Dordrecht, 2010).
- 59 Li, S., Dent, J. A. & Roy, R. Regulation of intermuscular electrical coupling by the *Caenorhabditis elegans* innexin *inx-6*. *Mol Biol Cell* **14**, 2630-2644 (2003). <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-11-0716>
- 60 Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D. & Ambros, V. Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* **10**, 3959-3970 (1991).

- 61 Kim, S., Spike, C. & Greenstein, D. Control of oocyte growth and meiotic maturation in
Caenorhabditis elegans. *Adv Exp Med Biol* **757**, 277-320 (2013).
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4015-4_10
- 62 ThermoFisher Scientific. Hoechst 33342,
<<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/H3570>> (2006-2023).
- 63 Zhang, N. *et al.* The C. elegans Intestine As a Model for Intercellular Lumen
Morphogenesis and In Vivo Polarized Membrane Biogenesis at the Single-cell Level:
Labeling by Antibody Staining, RNAi Loss-of-function Analysis and Imaging. *J Vis Exp*
(2017). <https://doi.org/10.3791/56100>
- 64 Lanjuin, A. & Sengupta, P. Specification of chemosensory neuron subtype identities in
Caenorhabditis elegans. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 22-30 (2004).
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.01.006>
- 65 Wolke, U., Jezuit, E. A. & Priess, J. R. Actin-dependent cytoplasmic streaming in C. elegans
oogenesis. *Development* **134**, 2227-2236 (2007). <https://doi.org/10.1242/dev.004952>
- 66 Grant, B. & Hirsh, D. Receptor-mediated endocytosis in the Caenorhabditis elegans
oocyte. *Mol Biol Cell* **10**, 4311-4326 (1999). <https://doi.org/10.1091/mbc.10.12.4311>
- 67 Kern, C. C. *et al.* C. elegans feed yolk to their young in a form of primitive lactation. *Nat*
Commun **12**, 5801 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25821-y>
- 68 Zhai, C. *et al.* Fusion and expansion of vitellogenin vesicles during Caenorhabditis elegans
intestinal senescence. *Aging Cell* **21**, e13719 (2022). <https://doi.org/10.1111/accel.13719>
- 69 Lopez, A. L., 3rd *et al.* DAF-2 and ERK couple nutrient availability to meiotic progression
during Caenorhabditis elegans oogenesis. *Dev Cell* **27**, 227-240 (2013).
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.008>
- 70 DePina, A. S. *et al.* Regulation of Caenorhabditis elegans vitellogenesis by DAF-2/IIS
through separable transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *BMC Physiol* **11**,
11 (2011). <https://doi.org/10.1186/1472-6793-11-11>
- 71 Lee, M. H. *et al.* Multiple functions and dynamic activation of MPK-1 extracellular signal-
regulated kinase signaling in Caenorhabditis elegans germline development. *Genetics*
177, 2039-2062 (2007). <https://doi.org/10.1534/genetics.107.081356>
- 72 Morgan, D. E., Crittenden, S. L. & Kimble, J. The C. elegans adult male germline: stem cells
and sexual dimorphism. *Dev Biol* **346**, 204-214 (2010).
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.07.022>
- 73 Cinquin, A. *et al.* Intermittent Stem Cell Cycling Balances Self-Renewal and Senescence of
the C. elegans Germ Line. *PLoS Genet* **12**, e1005985 (2016).
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005985>
- 74 Miller, M. A. *et al.* A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation
and ovulation. *Science* **291**, 2144-2147 (2001). <https://doi.org/10.1126/science.1057586>
- 75 Sornda, T. *et al.* Production of YP170 Vitellogenins Promotes Intestinal Senescence in
Caenorhabditis elegans. *The Journals of Gerontology: Series A* **74**, 1180-1188 (2019).
<https://doi.org/10.1093/gerona/glz067>
- 76 Hall, D. H. *Wormatlas*, (2018).
- 77 Hsin, H. & Kenyon, C. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of C.
elegans. *Nature* **399**, 362-366 (1999). <https://doi.org/10.1038/20694>
- 78 Uno, M. & Nishida, E. Lifespan-regulating genes in C. elegans. *NPJ Aging Mech Dis* **2**, 16010
(2016). <https://doi.org/10.1038/npjamd.2016.10>
- 79 Hodge, F., Bajuszova, V. & van Oosten-Hawle, P. The Intestine as a Lifespan- and
Proteostasis-Promoting Signaling Tissue. *Front Aging* **3**, 897741 (2022).
<https://doi.org/10.3389/fragi.2022.897741>

- 80 Chi, C. *et al.* Nucleotide levels regulate germline proliferation through modulating GLP-1/Notch signaling in *C. elegans*. *Genes Dev* **30**, 307-320 (2016).
<https://doi.org:10.1101/gad.275107.115>
- 81 Fitzgerald, K. & Greenwald, I. Interchangeability of *Caenorhabditis elegans* DSL proteins and intrinsic signalling activity of their extracellular domains in vivo. *Development* **121**, 4275-4282 (1995). <https://doi.org:10.1242/dev.121.12.4275>
- 82 Grant, B. & Greenwald, I. Structure, function, and expression of SEL-1, a negative regulator of LIN-12 and GLP-1 in *C. elegans*. *Development* **124**, 637-644 (1997).
<https://doi.org:10.1242/dev.124.3.637>
- 83 Fares, H. & Greenwald, I. Regulation of endocytosis by CUP-5, the *Caenorhabditis elegans* mucolipin-1 homolog. *Nat Genet* **28**, 64-68 (2001). <https://doi.org:10.1038/ng0501-64>
- 84 Winston, W. M., Molodowitch, C. & Hunter, C. P. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* **295**, 2456-2459 (2002).
<https://doi.org:10.1126/science.1068836>
- 85 Feinberg, E. H. & Hunter, C. P. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* **301**, 1545-1547 (2003). <https://doi.org:10.1126/science.1087117>
- 86 Appleford, P. J. *et al.* Functional redundancy of two nucleoside transporters of the ENT family (CeENT1, CeENT2) required for development of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Membr Biol* **21**, 247-259 (2004). <https://doi.org:10.1080/09687680410001712550>
- 87 Russell, J. C. *et al.* Composition of *Caenorhabditis elegans* extracellular vesicles suggests roles in metabolism, immunity, and aging. *Geroscience* **42**, 1133-1145 (2020).
<https://doi.org:10.1007/s11357-020-00204-1>
- 88 Evans, E. A., Chen, W. C. & Tan, M. W. The DAF-2 insulin-like signaling pathway independently regulates aging and immunity in *C. elegans*. *Aging Cell* **7**, 879-893 (2008).
<https://doi.org:10.1111/j.1474-9726.2008.00435.x>
- 89 Ezcurra, M. *et al.* *C. elegans* Eats Its Own Intestine to Make Yolk Leading to Multiple Senescent Pathologies. *Curr Biol* **28**, 2544-2556.e2545 (2018).
<https://doi.org:10.1016/j.cub.2018.06.035>
- 90 Starich, T. & Greenstein, D. A Limited and Diverse Set of Suppressor Mutations Restore Function to INX-8 Mutant Hemichannels in the *Caenorhabditis elegans* Somatic Gonad. *Biomolecules* **10** (2020). <https://doi.org:10.3390/biom10121655>
- 91 Starich, T. A., Bai, X. & Greenstein, D. Gap junctions deliver malonyl-CoA from soma to germline to support embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Elife* **9** (2020).
<https://doi.org:10.7554/eLife.58619>
- 92 Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94 (1974).
- 93 Seydoux, G., Savage, C. & Greenwald, I. Isolation and characterization of mutations causing abnormal eversion of the vulva in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **157**, 423-436 (1993). <https://doi.org:10.1006/dbio.1993.1146>

Figure legends

Figure 1. A small membrane-impermeable molecule transfers from the intestine to the germline. (A-B) Representative DIC images and fluorescence maximal projections of wild type adults that were or were not microinjected with 5-CF in the intestine, near the vulva (pipette tip). The intestine is delimited by the blue dashed line while the germline is delimited by a yellow dashed line. Scale bar, 100µm. (A'-B') Germline pachytene regions were enlarged and enhanced to allow visualization of the dimmer signal present in this area, where applicable. (C) Total fluorescence intensity measured in the whole animal (see Experimental procedures). The signal present in uninjected controls represents the background autofluorescence. (D) Average intestinal fluorescence intensity measured near the injection site. From here onwards, background autofluorescence was subtracted from both injected and uninjected controls. (E-H) DIC-GFP overlay images of the analysed regions. The displayed animal is a wild type adult that was injected in the intestine. The intensity of the fluorescence signal was measured by averaging three identical circular zones (green circles, numbered) per region, when the middle of the structure was in focus (See Experimental procedures). (E) Intestine. Pipette tip marks the injection site, the yellow dashed line circles the vulva. (F) Pachytene region. (G) -1 oocyte. (H) +1 egg. (I-N) Graphical representation of the average 5-CF fluorescence intensity measured in the different regions analyzed. (C-D, I-N) Sample size, for each treatment: 9 and 23, respectively. Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$; Two-tailed t-tests).

Figure 2. A larger molecule does not transfer from the intestine to the germline. (A-C) Representative DIC and fluorescence maximal projections of wild type adults that were (A) microinjected with GFP in the intestine, near the vulva (pipette tip), or soaked in (B) Hoechst or (C) 5-CF. (A-C) The intestine is delimited by the blue dashed line while the germline is delimited by a yellow dashed line. Scale bar, 100µm. (A'-C') Germline pachytene regions were enlarged and enhanced to allow visualization of the dimmer signal present in this area, where applicable.

Figure 3. Small variations in the intestinal microinjection site do not affect 5-CF transfer to the germline. (A) Graphical representation of the 5-CF diffusion across the intestine of wild type adults injected either just anterior or just posterior to the vulva (See Experimental procedures). (B) Relative fraction of 5-CF that ended up in the 5 different arbitrary antero-posterior sections of the intestine. Zone 1 is the anterior 20% of the intestine, and zone 3 is the middle portion, encompassing the injection site. Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$; Two-tailed t-tests). (C-H) Representation of the average 5-CF fluorescence intensity measured in the different germline regions analyzed according to the injection sites. (A-H) Sample size, for each treatment: 7 and 10, respectively. Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$; Two-tailed t-tests).

Figure 4. A fraction of 5-CF transfers from the intestine to the germline independently from the RME-2 yolk exo/endocytosis route. (A-C) Representative DIC and fluorescence maximal projections of wild type and *rme-2* mutant adults that were or were not microinjected with 5-CF in the intestine, near the vulva. The intestine is delimited by the blue dashed line while the germline is delimited by a yellow dashed line. Scale bar, 100µm. (B'-C') Germline pachytene regions were enlarged and enhanced to allow visualization of the dimmer signal present in this area, where applicable. (D-I) Graphical representation of the average 5-CF fluorescence intensity measured in the different regions analyzed. Sample size, for each genotype: 23 and 29. Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$; Two-tailed t-tests).

Figure 5. A small membrane-impermeable molecule transfers from the germline to the intestine. (A-C) Representative DIC and fluorescence maximal projections of wild type adults that were or were not microinjected with 5-CF in the pachytene region of the anterior or posterior gonad arm (pipette tip). The intestine is delimited by the blue dashed line while the germline is delimited by a yellow dashed line. Scale bar, 100µm. (D-J) Graphical representation of the average 5-CF fluorescence intensity measured in the different regions analyzed. (K) Graphical representation of the 5-CF average fluorescence intensity ratios between the intestine and the germline pachytene region depending on the injection site. (D-K) Sample sizes, for each treatment: 9 and 11, respectively. Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$; Two-tailed t-tests).

Figure 6. Reduced IIS does not affect intestine to distal germline 5-CF transfer. (A-E) Representative DIC and fluorescence maximal projections of wild type and IIS mutant adults that were or were not microinjected with 5-CF in the intestine near the vulva. The intestine is delimited by the blue dashed line while the germline is delimited by a yellow dashed line. Scale bar, 100µm. (F-K) Graphical representation of the average 5-CF fluorescence intensity measured in the different regions analyzed. Sample sizes, for each genotype, from left to right: 23, 24, 18, 24 and 14. Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$; ANOVA followed by Tukey's post-hoc tests).

Figure 7. Reduced MPK-1 signaling does not affect intestine to distal germline 5-CF transfer. (A-C) Representative DIC and fluorescence maximal projections of *fog-1*, *fog-1*; *aak-1* and *mpk-1* mutant adults that were microinjected with 5-CF in the intestine near the vulva. The intestine is delimited by the blue dashed line while the germline is delimited by a yellow dashed line. Scale bar, 100µm. (C) A membrane labelling RFP was introduced to facilitate analysis. (D-G) Graphical representation of the average 5-CF fluorescence intensity measured in the different regions analyzed. Sample sizes, for each genotype, from

left to right: 23, 19, 22 and 13. Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$; ANOVA followed by Tukey's post-hoc tests).

Figures

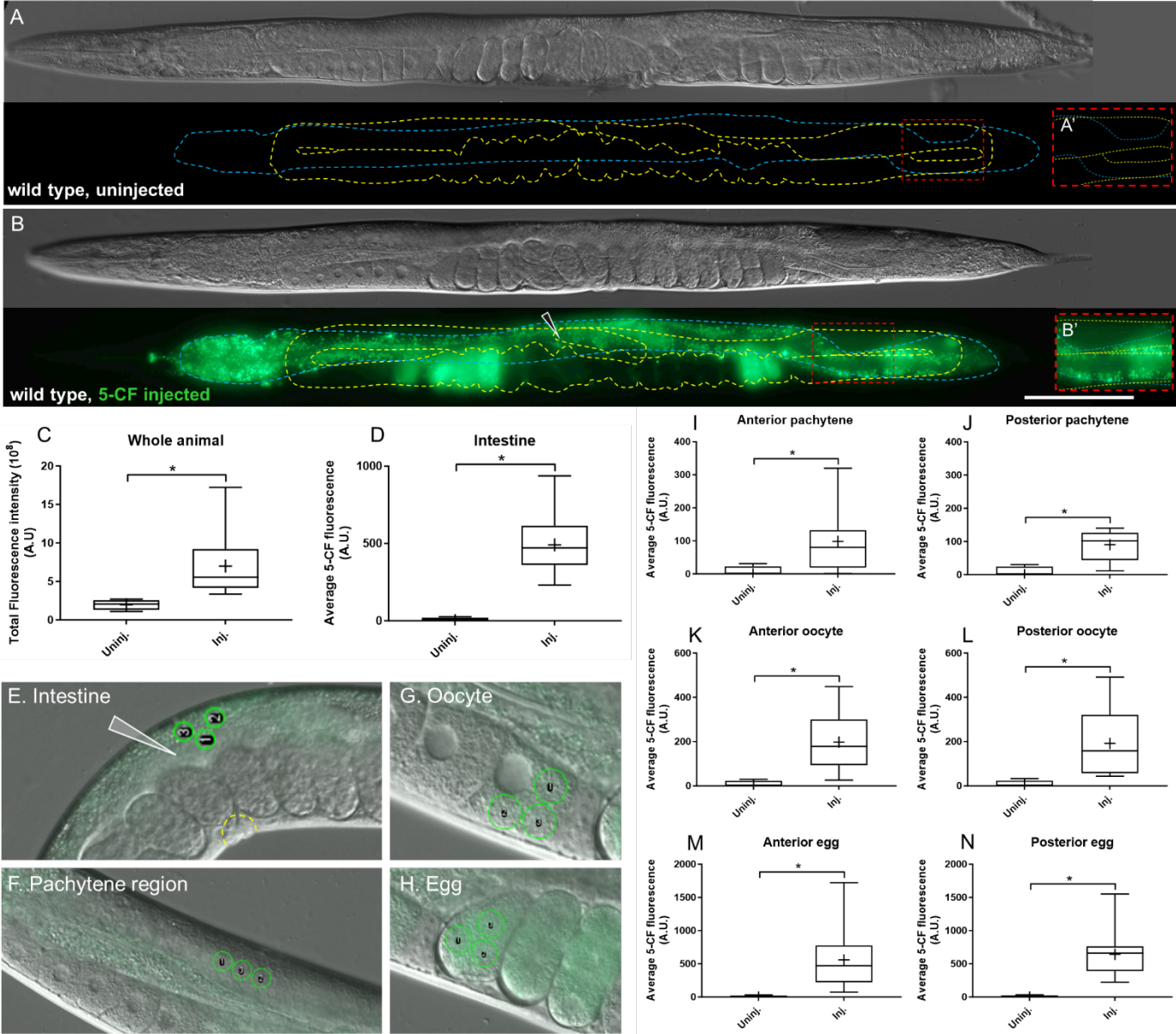


Figure 1

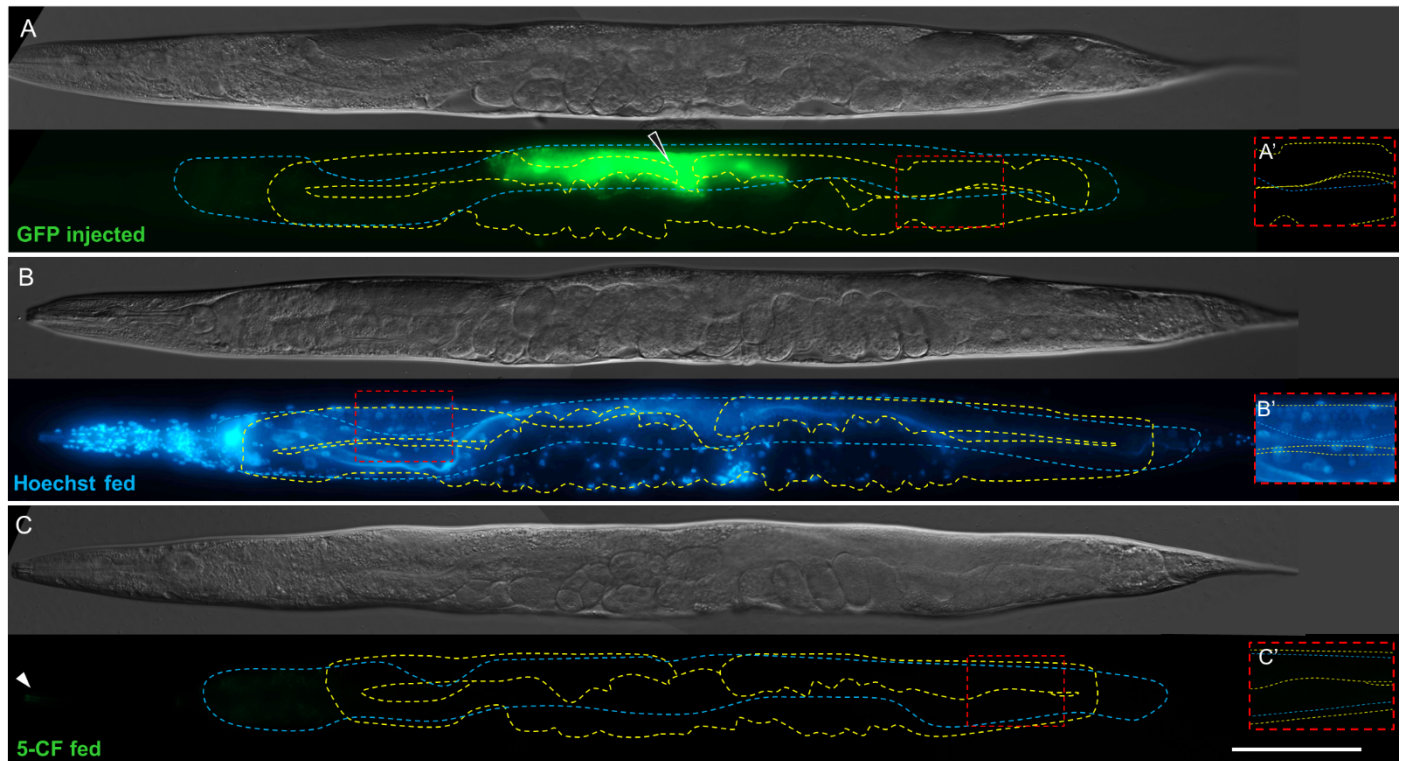


Figure 2

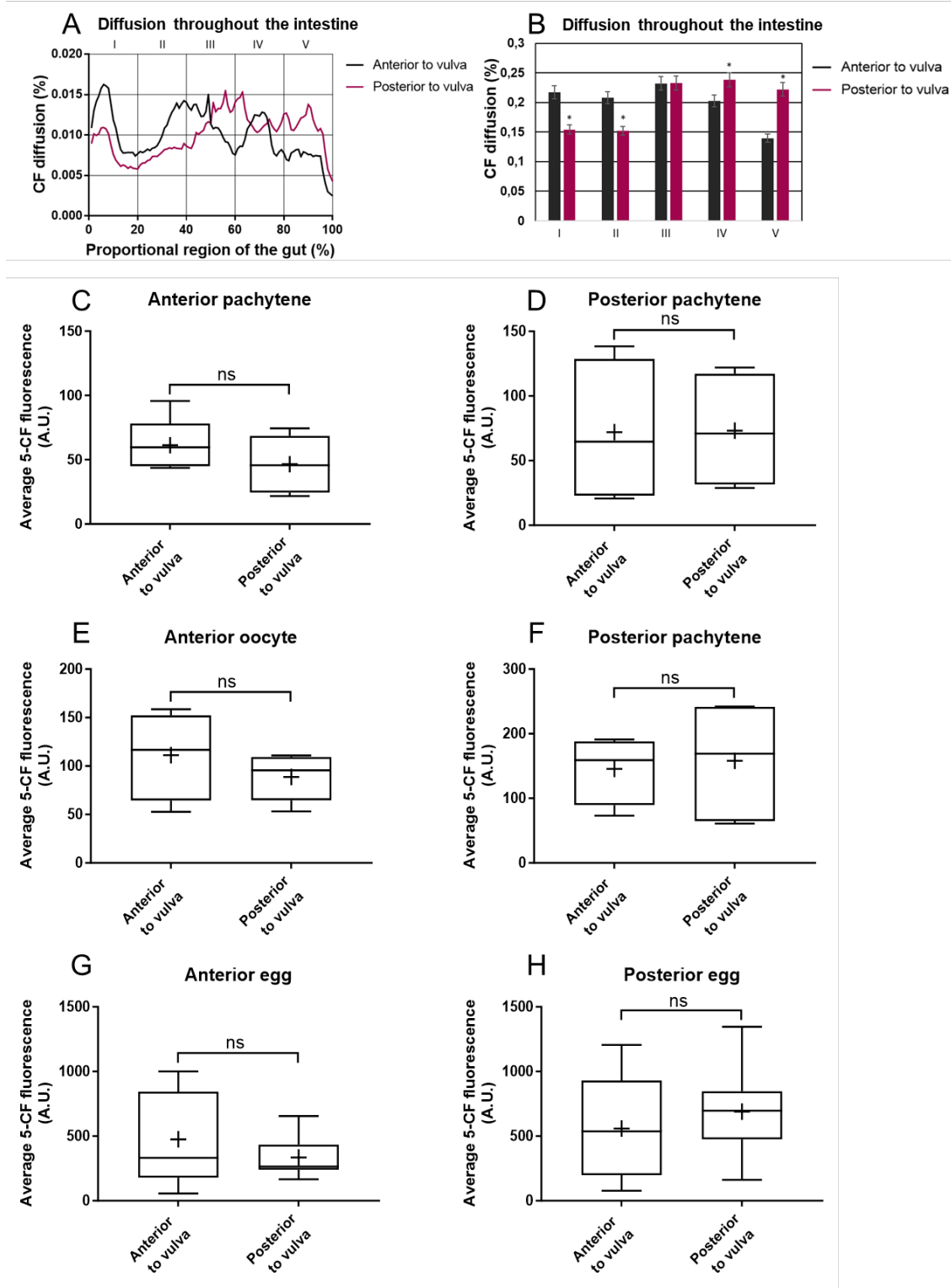


Figure 3

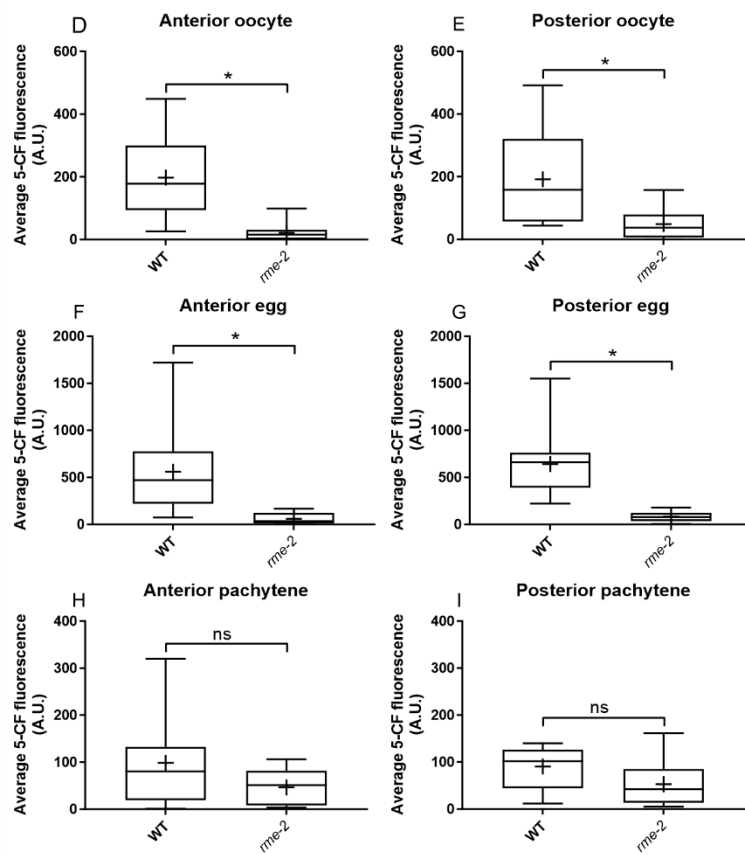
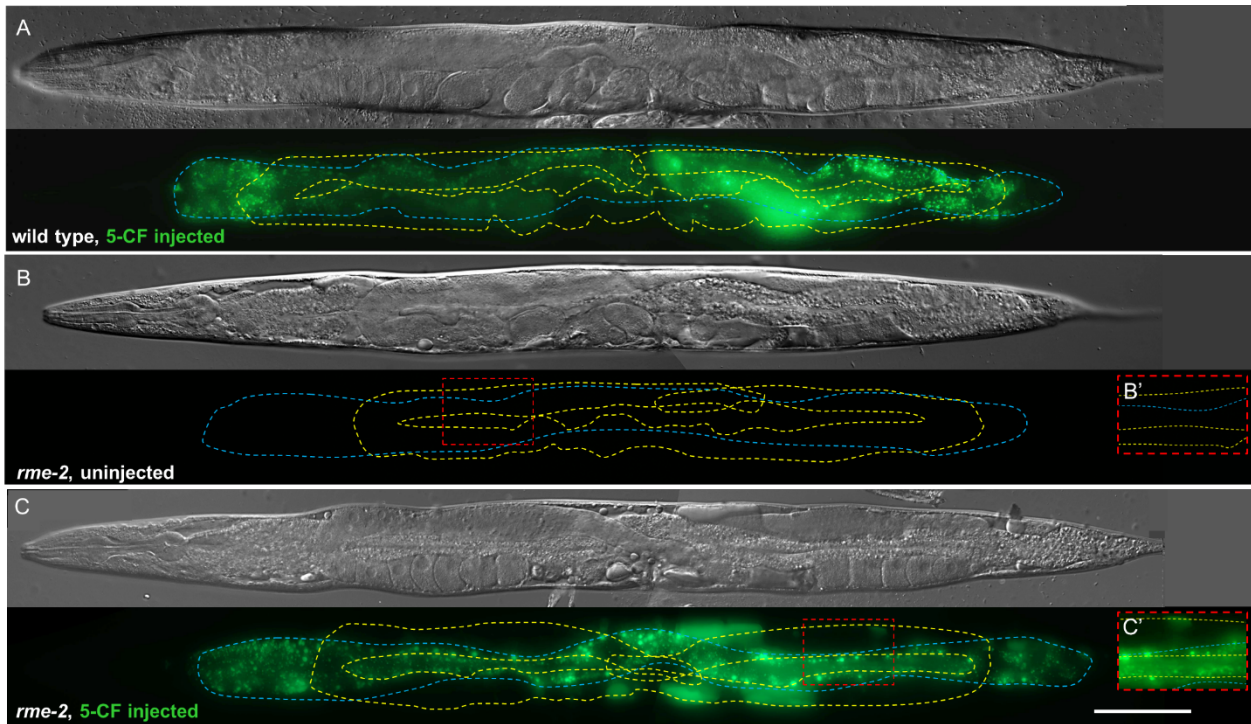


Figure 4

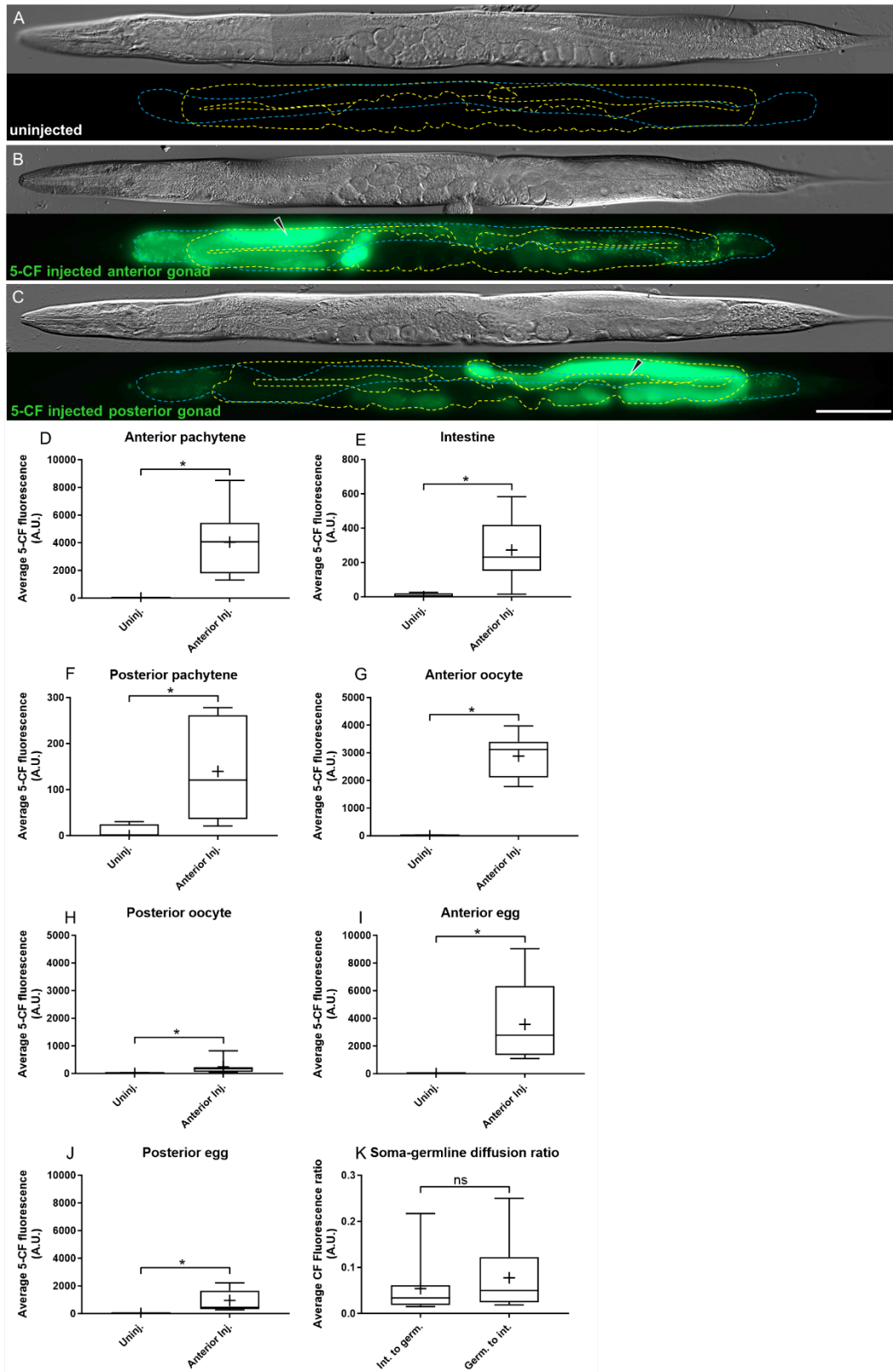


Figure 5

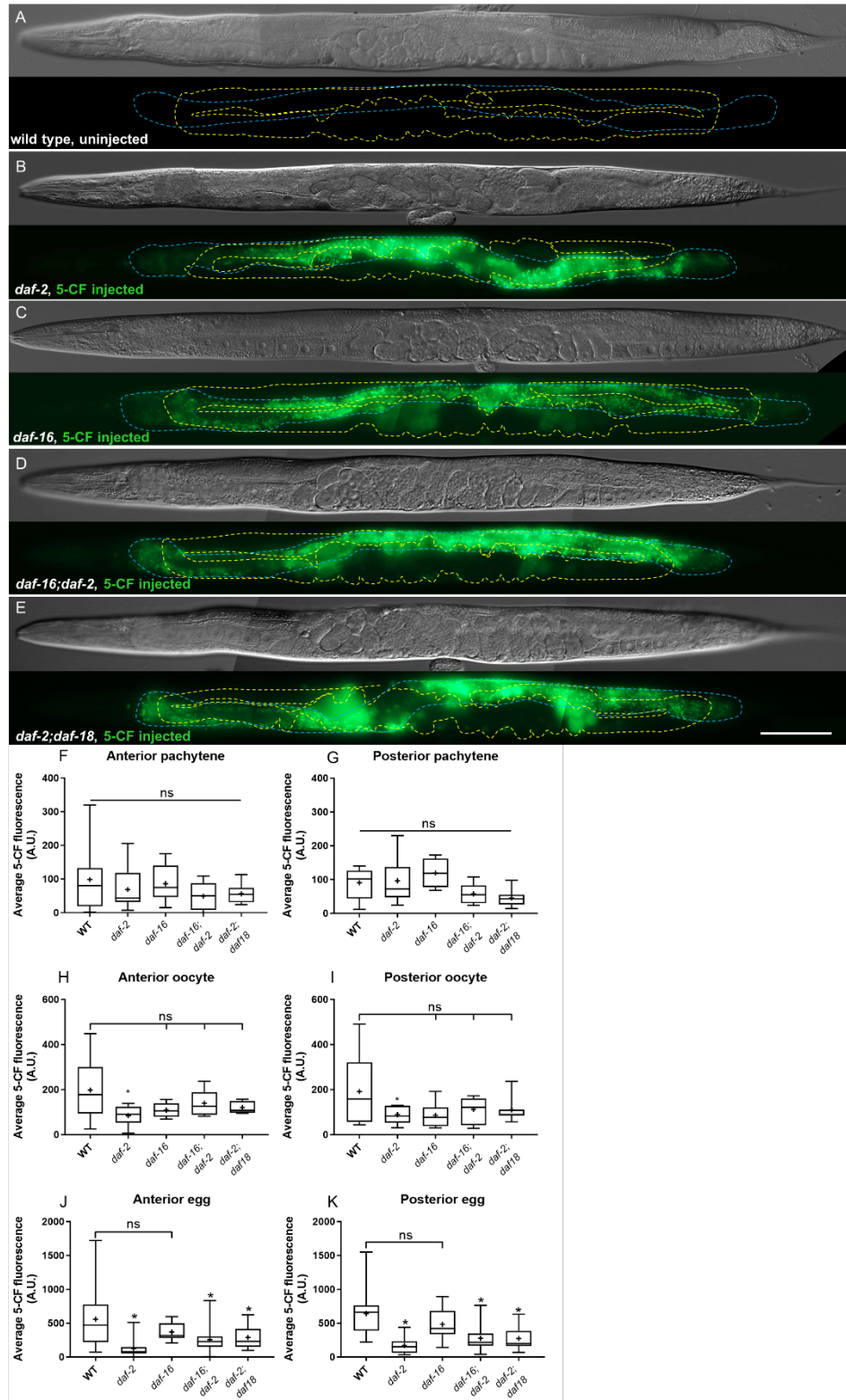


Figure 6

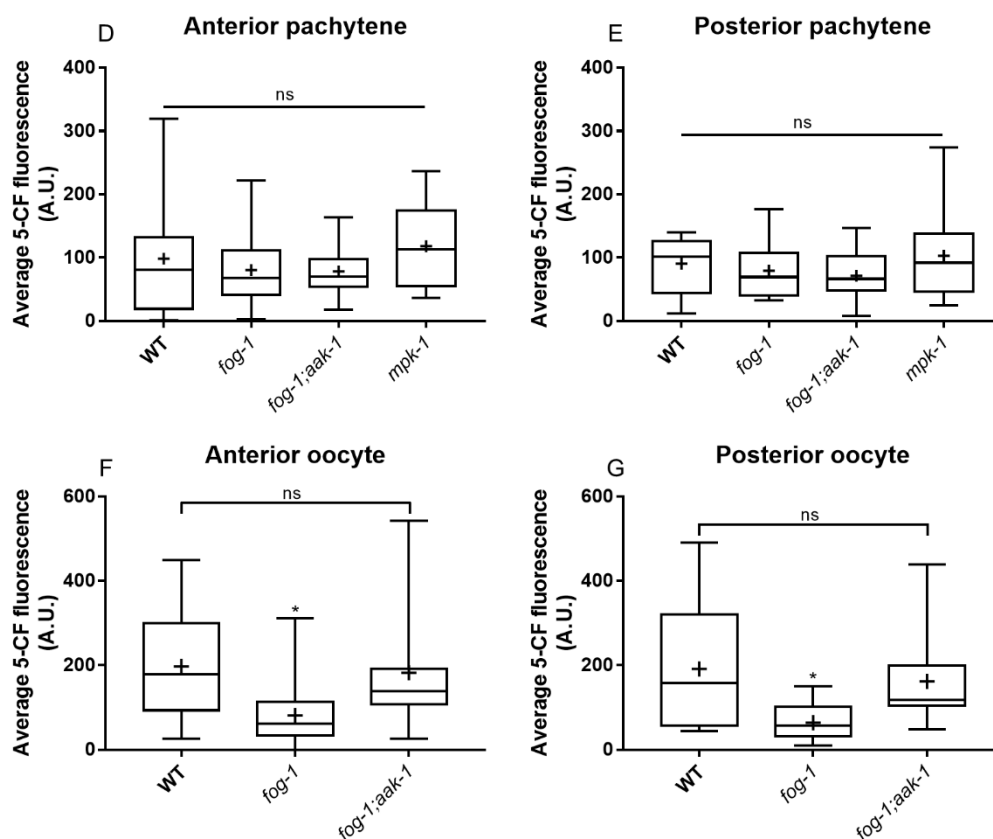
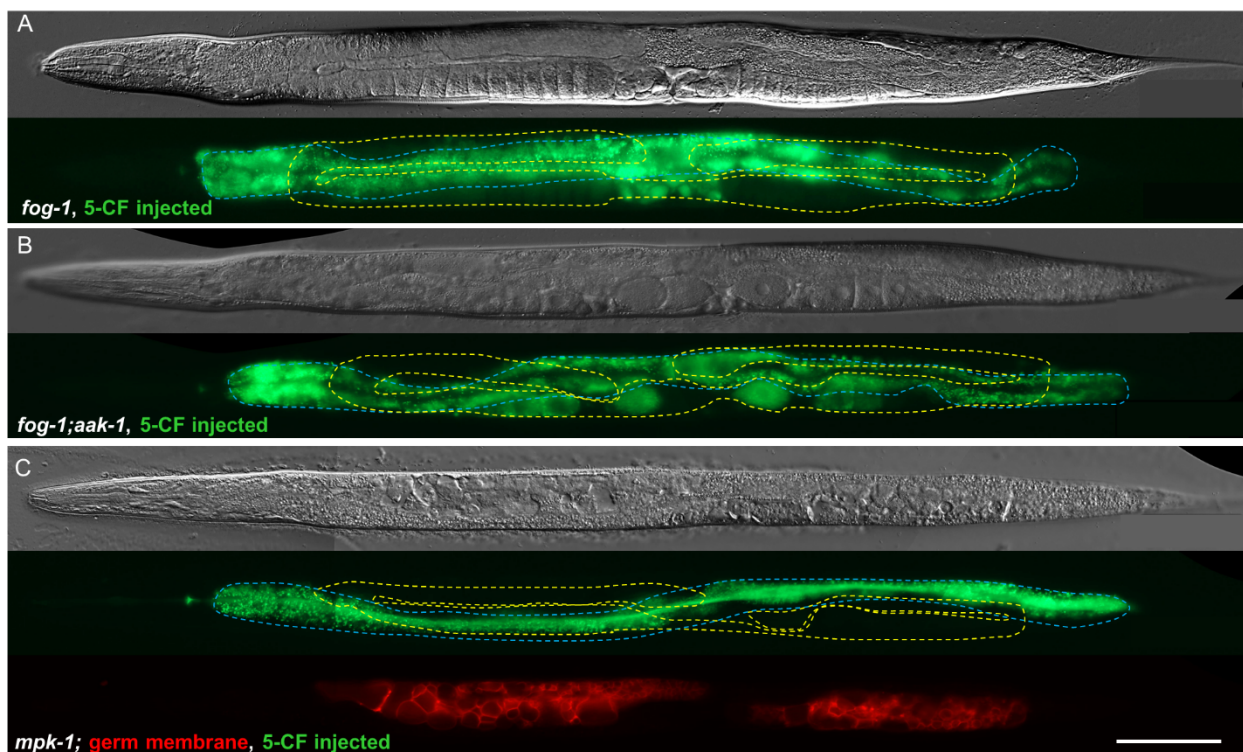


Figure 7

CHAPITRE III

CONCLUSION

Les travaux de recherche effectués dans notre laboratoire ont pour objectifs de comprendre les mécanismes de régulation homéostatique des cellules souches, et plus particulièrement ceux qui régulent leur niveau de prolifération. Étant donné l'impact prédominant de la protéine MPK-1 sur la prolifération des CSG chez *C. elegans*, elle s'y retrouve particulièrement étudiée.

L'objectif global de mon projet de recherche était de déterminer si de petites molécules imperméables aux membranes, qui pourraient être générées en aval de l'activité MPK-1 et promouvoir la prolifération des CSG, pouvaient effectivement voyager depuis l'intestin, d'où MPK-1 supporte la prolifération des CSG, pour se rendre dans la lignée germinale. Ainsi, il était question de suivre le patron de diffusion de la 5-CF, une petite molécule imperméable aux membranes, suite à son injection dans l'intestin de l'animal.

Les jonctions communicantes formées par les innexines permettent le passage de petites molécules allant jusqu'à 2 kDa (Bossinger and Schierenberg 1996). Nous avons sélectionné la 5-CF, un colorant imperméable aux membranes fluorescent de 0,376 kDa, comme molécule pouvant diffuser d'une cellule à une autre à travers ces jonctions (Magni 2010). La 5-CF avait d'ailleurs déjà été utilisé avec succès pour visualiser la diffusion à travers les innexines du pharynx chez *C. elegans* (Li, Dent et al. 2003). Afin de s'assurer que la 5-CF était bien imperméable aux membranes nous avons utilisé différents contrôles. La GFP est une autres molécules qui est imperméables aux membrane mais qui ne peut passer à travers les jonctions communicantes étant donné son poids moléculaires de 27 kDa. Comme prévu, la GFP micro-injectée dans l'intestin est restée limitée aux quelques cellules intestinales autour du site d'injection et elle n'a pas diffusé dans les cellules intestinales plus éloignées ou dans les autres tissus environnants. Cela montre également que l'ensemble laissé après la micro-injection est immédiatement scellé

lorsque la micro-aiguille est retirée, et que la procédure n'entraîne pas de fuite significative. Nous avons ensuite utilisé un colorant fluorescent perméable aux cellules, le Hoechst, pour exclure la possibilité que le 5-CF ait pu générer un tel motif en diffusant à travers les membranes cellulaires. Ces différents contrôles nous ont donc aussi permis de conclure que le schéma de diffusion que nous avons observé n'était pas dû à des perturbations de la membrane au cours des manipulations.

Lors de l'injection de la 5-CF dans l'intestin de l'animal, la présence de jonctions communicantes qui relient toutes les cellules de ce tissu entre elles permettait au colorant de s'égaliser de manière plutôt égale sur toute la longueur de l'intestin (Hall 2018). Par la suite, une fraction du colorant atteignait la lignée germinale, dont une grande partie utilisait la voie exo/endocytose RME-2 afin d'atteindre la lignée germinale proximale. La voie exacte empruntée par la petite fraction restante du colorant pour se rendre de l'intestin à la lignée germinale reste cependant inconnue. Il est important de mentionner que de petites variations dans le site d'injection intestinal affectent légèrement la distribution intra-intestinale du colorant mais n'ont pas d'impact significatif sur le transfert du colorant vers la lignée germinale.

Une partie du colorant était donc transférée de l'intestin vers la lignée germinale et on ne semble pas observer une accumulation notable dans d'autres parties de l'animal. La 5-CF n'a pas été quantifiée dans d'autres endroits dans le vers et il serait pertinent de la faire pour la suite de ce projet. Le transfert principal du colorant de l'intestin vers la lignée germinale semble s'être produit via la voie de l'exo/endocytose, nécessitant le récepteur vitellin RME-2. La voie de l'exo/endocytose chez *C. elegans* est à la base connue pour jouer un rôle dans le transport de l'intestin vers les ovocytes des protéines vitellines (Grant and Hirsh 1999). Celles-ci sont nécessaires pour la maturation de l'ovocyte. Les mutants qui n'expriment pas le gène *rme-2* se caractérisent par des ovocytes légèrement petits et dépourvus de protéines vitellines, une morphologie de la lignée germinale plutôt normale, une accumulation importante de protéines vitellines dans le pseudocœlome, une production réduite d'embryons et une faible viabilité embryonnaire (Grant and Hirsh 1999). Les protéines vitellines sont synthétisées dans l'intestin, sécrétées dans le

pseudocœlome et endocytées par les ovocytes par l'intermédiaire du récepteur vitellin, RME-2, une molécule semblable au récepteur LDL qui est spécifiquement exprimée par les ovocytes (Figure 13) (Kimble and Sharrock 1983, Sharrock 1983, Goldstein, Brown et al. 1985, Spieth, Nettleton et al. 1991, Schneider 1996). Si la 5-CF avait une certaine affinité pour les protéines vitellines, ceci expliquerait pourquoi la 5-CF qui était injecté dans l'intestin a abondamment marqué les ovocytes, surtout les plus proximaux qui pratiquent plus d'endocytose. De plus, durant la période d'incubation, certains ovocytes se sont transformés en œufs, ce qui explique pourquoi la 5-CF se retrouve également à cet endroit.

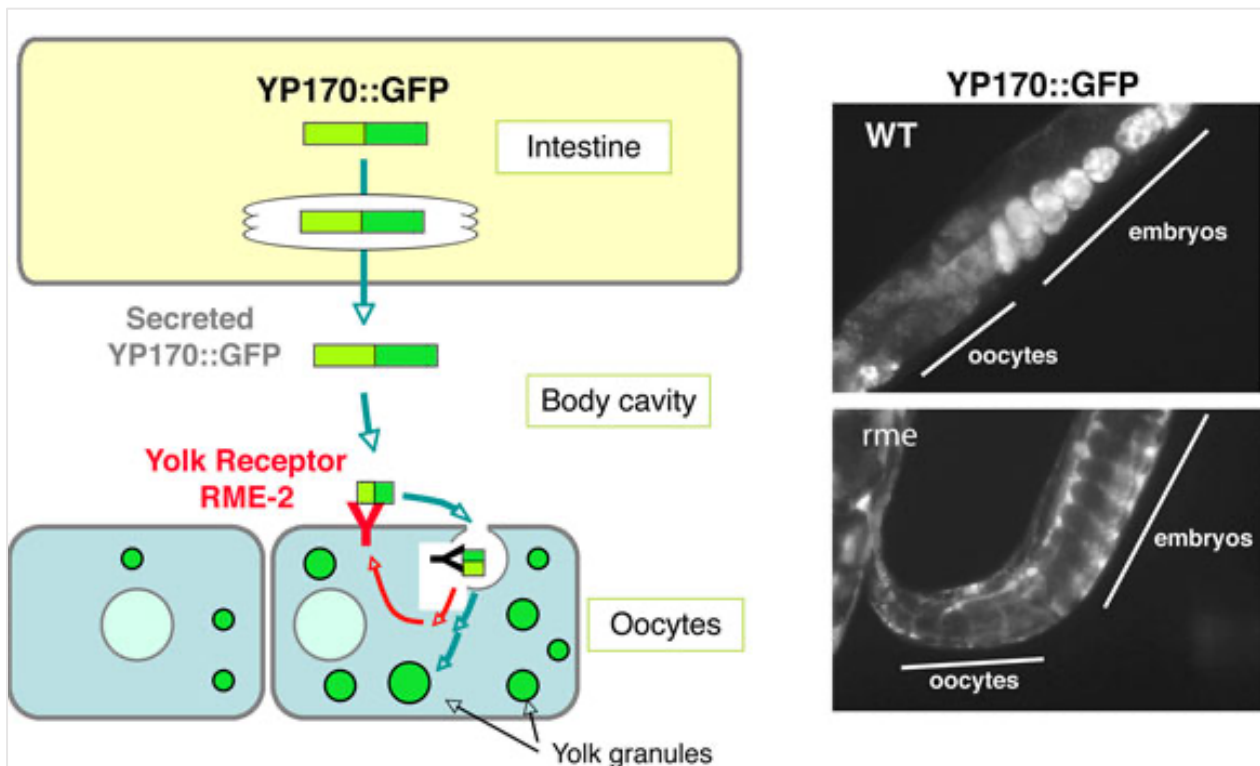


Figure 13. Endocytose des protéines vitellines par les ovocytes.

YP170::GFP, qui consiste en une protéine vitelline couplé à une molécule de GFP, est synthétisé dans l'intestin et sécrété dans la cavité corporelle d'où il est endocyté par les ovocytes. RME-2 est le récepteur vitellin exprimé dans les ovocytes. Des micrographies fluorescentes de vers de type sauvage et de vers mutants *rme-2* typiques exprimant YP170::GFP sont montrées. Chez les vers sauvage, les protéines vitellines se retrouvent dans les ovocytes, tans que dans les mutants *rme-2*, les ovocytes sont dans l'incapacité d'endocyter les protéines vitellines. (Grant et Sato, Wormbook)

Une partie de la 5-CF injecté dans l'intestin étant significativement détectable dans la région du pachytène, on en conclut qu'il existe une voie de passage qui relie spécifiquement l'intestin à la lignée germinale qui est indépendante de RME-2. Une influence de l'intestin sur la lignée germinale pourrait ainsi être importante pour l'homéostasie de la fonction germinale. Des travaux antérieurs ont montré qu'il existe déjà quelques interactions entre l'intestin et la lignée germinale. Comme mentionné précédemment, MPK-1/ERK est nécessaire, dans l'intestin de l'animal ou dans la gonade somatique, pour favoriser la prolifération des CSG (Robinson-Thiewes, Dufour et al. 2021). Un autre exemple a été la constatation que la cytidine désaminases, une enzyme nécessaire dans le métabolisme des nucléotides par sa production d'uridine, est nécessaire dans l'intestin ou la gonade somatique de l'animal pour promouvoir encore une fois de manière non autonome, la prolifération des CSG chez *C. elegans* (Chi, Ronai et al. 2016). Dans cet exemple-ci, la faible quantité d'uridine dans l'intestin et la gonade somatique supprimait la signalisation GLP-1/Notch et réduisait la prolifération des CSG (Chi, Ronai et al. 2016).

Nos propres résultats indiquent maintenant que de petites molécules imperméables à la membrane, tel que l'uridine, peuvent effectivement être transférées de l'intestin à la lignée germinale, très probablement par l'intermédiaire de la gonade somatique. L'uridine pourrait ainsi utiliser les jonctions communicantes que l'on retrouve au niveau des cellules de la gaine somatique étant donné qu'elle a une taille lui permettant de passer par le pore (Cotrina, Lin et al. 1998, Stout, Costantin et al. 2002).

Nos résultats ont également démontré que le transfert de la 5-CF entre l'intestin et la lignée germinale est bidirectionnel. En effet, en effectuant l'expérience inverse, soit en injectant la 5-CF dans la région du pachytène, il a été possible d'observer une accumulation du colorant dans l'intestin. La lignée germinale pourrait donc elle aussi utiliser de petites molécules imperméables aux membranes afin d'influencer des fonctions dites somatiques, tel que le vieillissement. À titre d'exemple, il est déjà connu chez *C. elegans* que l'ablation de la lignée germinale entraîne une augmentation de leur durée de vie via la régulation de voies de signalisation dans l'intestin (Hsin and Kenyon 1999, Uno and Nishida 2016).

Chez *C. elegans*, l'intestin est séparé de la gonade somatique et de la lignée germinale par un espace contenant du liquide interstitiel : le pseudocœlome (Hall 2018). Le pseudocœlome est également un lieu de résidence pour les cœlomocytes, six cellules de récupération qui endocytent de manière non spécifique le liquide interstitiel pseudocœlomique (Fares and Greenwald 2001). Bien que les molécules naturelles qui sont éliminées de la cavité corporelle par les cœlomocytes soient inconnues, ces derniers sont capables d'éliminer de nombreux composés étrangers de la cavité corporelle après qu'ils ont été introduits dans l'organisme (Fares and Greenwald 2001). À titre d'exemple, lorsque la molécule de la GFP est sécrétée dans le pseudocœlome à partir de n'importe quel tissu, il a été observé qu'elle était principalement absorbée par les cœlomocytes (Fitzgerald and Greenwald 1995, Grant and Greenwald 1997, Fares and Greenwald 2001). Dans de précédents travaux, plusieurs autres colorants ont été introduit afin d'étudier l'endocytose par les cœlomocytes de l'animal. Il a alors été noté que parmi les petites molécules testées, seuls les colorants qui semblaient adhérer aux granules de protéines vitellines n'étaient pas efficacement endocytés par les cœlomocytes. Elles se retrouvaient plutôt dans les ovocytes (Fares and Greenwald 2001). Par analogie, il serait possible que la 5-CF ait adhéré aux granules de protéines vitellines et ait été sécrété de l'intestin dans le pseudocœlome par exocytose en même temps que celles-ci. Cela expliquerait pourquoi une grande partie de la 5-CF injectée lors de nos travaux a été endocytée par les ovocytes via les récepteurs RME-2. La partie restante de colorant pourrait alors être absorbé dans

la lignée germinale par un autre récepteur de type RME. Il serait important pour la suite de s'assurer que les coelomocytes n'accumulent pas des quantités significatives de 5-CF. De plus, il serait intéressant de tester si la 5-CF se lie effectivement avec les protéines vitellines. Pour ce faire, il serait intéressant d'utiliser une microscopie confocale afin de quantifier la fluorescence du colorant de manière plus précise. La microscopie confocale fournit des images avec un contraste élevé, facilitant la distinction entre différentes structures dans des échantillons biologiques. Il nous permettrait également de visualiser les coelomocytes, qui sont considérés comme des détails cellulaires plus fins.

Cependant, nos résultats indiquent une voie bidirectionnel étant donné que la proportion de colorant injecté transfère de manière inverse, mais proportionnellement similaire, qu'il soit injecté dans l'intestin ou la lignée germinale. La voie empruntée par la 5-CF pour passer de la lignée germinale à l'intestin demeure toutefois obscure, car le transport des protéines vitellines se produit de manière unidirectionnelle de l'intestin à la lignée germinale (Grant and Hirsh 1999, Kern, Townsend et al. 2021, Zhai, Zhang et al. 2022).

Comme mentionné précédemment, la 5-CF est suffisamment petite pour passer par les jonctions communicantes et celles-ci pourraient donc jouer un certain rôle dans le transfert entre la lignée germinale et l'intestin. Cette question reste toutefois en suspens parce qu'à ce jour, dans la littérature, il n'y a toujours pas d'évidence que des jonctions communicantes relient ces deux tissus qui sont séparés par le pseudocœlome.

Des recherches ont récemment révélé l'importance des jonctions communicantes dans la défense immunitaire de l'intestin chez *C. elegans*. Dans cette exemple-ci, ce sont des petites molécules, ici aussi encore inconnus, qui utilisent les jonctions communicantes pour faire le pont entre l'intestin et la lignée germinale. En effet, *inx-14*, une sous-unité de la jonction communicante, prévient la défense intestinale, car les mutants dépourvus de ce gène présentent une résistance fortement accrue à l'infection par *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (Starich, Hall et al. 2014, Zhang, Wang et al. 2023). Cette axe de

signalisation implique non seulement INX-14 mais aussi GLP-1/Notch, qui est exprimé dans la gonade et qui régule ainsi la défense intestinale de manière non-autonome (Zhang, Wang et al. 2023). INX-14 régule ainsi la signalisation de la gonade jusqu'à l'intestin. Dans cet exemple-ci, la voie INX-14/GLP-1 utilise les lysosomes afin de médier la réponse intestinale. Il serait en fait possible que INX-14 régule le calcium, le malonyl-CoA (Starich, Bai et al. 2020) ou d'autres messagers tels que le GMP cyclique (Shuhaibar, Egbert et al. 2015) qui déclenche le clivage et l'activation de Notch/GLP-1 (Kopan and Ilagan 2009) dans la gonade, qui transduit ensuite le signal Notch/GLP-1 activé vers les cellules épithéliales de l'intestin et déclenche la voie des lysosomes intestinaux (Zhang, Wang et al. 2023). L'investigation de la voie des lysosomes pourrait être une piste à explorer pour la suite de ce projet afin de voir si la 5-CF utilise aussi cette voie de signalisation.

Afin d'investiguer d'avantage l'éventualité que la 5-CF passe belle et bien par les jonctions communicantes que l'on retrouve au niveau de la gonade, il serait d'abord pertinent de voir s'il y a du transfert au niveau des cellules de la gaine somatique. La visualisation d'un colorant ou d'un marqueur fluorescent dans les cellules de la gaine est toutefois difficile car elles sont beaucoup plus fines en comparaison aux cellules qui composent la lignée germinale, qui, en comparaison, sont beaucoup plus épaisses. Lorsqu'il y a de la fluorescence dans la lignée germinale, cela « écrase » celle provenant de la gaine, de sorte qu'il est quasi impossible de séparer les deux signaux. Dans des expérience précédente conduite par d'autres membres de notre laboratoire, il a récemment été découvert que MPK-1/ERK était fortement phosphorylé dans les cellules de la gaine, mais nous ne pouvions détecter ce signal que lorsque MPK-1 était supprimé de la lignée germinale (Robinson-Thiewes, Dufour et al. 2021). Une expérience future serait d'injecter de la 5-CF dans l'intestin de mutants qui expriment un marqueur de fluorescence au niveau des cellules de la gaine somatique, permettant ainsi leur visualisation. Il serait alors possible de quantifier si la 5-CF passe dans les cellules de la gaine somatique avant d'entrer dans la lignée germinale.

Dans la même ligne de pensée, le projet original n'investigue pas de manière directe les jonctions communicantes, avec, par exemple, l'utilisation de mutants qui n'exprime pas de jonctions communicantes au niveau de la gonade. Ces mutants pourraient confirmer que la 5-CF utilise bien les jonctions communicantes à un certain moment lors de son transfert de l'intestin jusqu'à la lignée germinale. Ceci constitue toutefois encore un problème pour notre objectif principal étant donné que de tels mutants sont alors stériles et que leur lignée germinale ne contient que quelques cellules (Starich, Hall et al. 2014). Leur lignée germinale n'étant pas développée, il serait alors plus difficile d'expliquer un lien possible entre la fonction de MPK-1 et les jonctions communicantes.

Finalement, afin de déterminer si la modulation des jonctions communicantes pouvait expliquer la régulation du taux de prolifération des CSG par le transfert de petites molécules entre la gonade somatique et la lignée germinale, nous avons micro-injecté la 5-CF dans l'intestin de différents mutants des voies de signalisation insuline/IGF-1 et MPK-1 chez lesquels la prolifération des CSG est connue pour être réduite. Nous avons constaté que l'efficacité du transfert de la 5-CF de l'intestin vers la région du pachytène restait stable dans tous les milieux génétiques testés, quel que soit leur taux de prolifération des CSG. Le transfert du 5-CF vers les ovocytes (et les œufs) était cependant réduit chez les mutants *daf-2* et *fog-1*. Chez les mutants *daf-2*, cela est probablement lié au ralentissement de la maturation des ovocytes et à la réduction de la production des protéines vitellines chez ces mutants qui est, comme mentionné précédemment, la principale voie de transfert du colorant de l'intestin vers les ovocytes (DePina, Iser et al. 2011, Lopez, Chen et al. 2013). Chez les mutants *fog-1*, ceci s'explique plutôt par la réduction du transport des protéines vitellines lorsque les spermatozoïdes sont épuisés et que les ovocytes s'arrêtent et s'accumulent (Sornda, Ezcurra et al. 2019). Ensemble, ces résultats nous amènent à penser que la diminution de la régulation de la prolifération des CSG qui se produit lorsque la signalisation insuline/IGF-1 et MPK-1 est réduite ne limite pas de manière significative le transfert de la 5-CF de l'intestin vers la lignée germinale distale. Ainsi, la fermeture des jonctions communicantes ne pourrait pas

expliquer les taux réduits de prolifération des CSG qui caractérisent les mutants MPK-1, ni sous-tendre la régulation homéostatique de la prolifération des CSG. Nos résultats établissent plutôt la possibilité que l'activité de la protéine MPK-1 dans l'intestin ou la gonade somatique puisse générer de petites molécules imperméables à la membrane qui pourraient être transférées de l'un ou l'autre de ces tissus vers la lignée germinale, où elles favoriseraient la prolifération des CSG. Ces petites molécules pourraient emprunter la voie de l'exo/endocytose pour se rendre dans la lignée germinale quand elles sont générées par l'intestin, et les jonctions communicantes quand elles sont générées par la gonade somatique.

Les interactions entre les tissus somatiques et la lignée germinale existent chez de nombreux autres organismes et la perturbation de ces interactions perturbe plusieurs aspects du développement et de la fonction des cellules germinales, ce qui peut avoir des conséquences importantes sur la santé et la survie de l'organisme (McCarter, Bartlett et al. 1997, Hall, Winfrey et al. 1999, Schulz, Wood et al. 2002). Le transfert de petites molécules imperméables à la membrane à travers les tissus peut être impliqué dans une série de processus de développement et de signalisation intercellulaire. Sa dérégulation pourrait ainsi sous-tendre plusieurs pathologies, y compris celles impliquant des défauts de prolifération des cellules souches, telles que de nombreuses maladies dégénératives et cancers. Le cancer est la principale cause de décès au Canada (Statistique Canada, 2024). Les traitements les plus conventionnels proposés contre le cancer comprennent souvent un retrait chirurgical de la tumeur suivi par un traitement de radiothérapie ou de chimiothérapie. Ces traitements comportent toutefois plusieurs inconvénients. La chirurgie est souvent plus efficace dans un stade précoce du développement de la maladie, alors que la radiothérapie peut endommager les cellules et/ou les tissus sains et un problème majeur rencontré avec les traitements de chimiothérapie est la chimiorésistance. Il est donc primordial de développer des traitements anticancéreux plus efficaces à long terme pour diminuer le taux de décès par le cancer. La découverte et la compréhension de certains des mécanismes régulatoires de la prolifération des cellules souches pourraient ainsi permettre des retombées dans le domaine biomédical,

notamment envers la conception de nouveaux traitements précis contre le cancer. Comprendre le processus par lequel les signaux de MPK-1A chez *C. elegans* sont acheminés au site d'intérêt, et quels sont-ils, pourrait faciliter la prévention et le traitement du cancer, ainsi que toutes les thérapies à base de cellules souches.

Bibliographie

(2010). Detection of Bacteria, Viruses, Parasites and Fungi, Springer Dordrecht.

Aasen, T., S. Johnstone, L. Vidal-Brime, K. S. Lynn and M. Koval (2018). "Connexins: Synthesis, Post-Translational Modifications, and Trafficking in Health and Disease." Int J Mol Sci **19**(5).

Albert, P. S. and D. L. Riddle (1983). "Developmental alterations in sensory neuroanatomy of the *Caenorhabditis elegans* dauer larva." J Comp Neurol **219**(4): 461-481.

Alison, M. R., R. Poulsom, S. Forbes and N. A. Wright (2002). "An introduction to stem cells." J Pathol **197**(4): 419-423.

Altun, Z. F., B. Chen, Z. W. Wang and D. H. Hall (2009). "High resolution map of *Caenorhabditis elegans* gap junction proteins." Dev Dyn **238**(8): 1936-1950.

Amit, I., A. Citri, T. Shay, Y. Lu, M. Katz, F. Zhang, G. Tarcic, D. Siwak, J. Lahad, J. Jacob-Hirsch, N. Amariglio, N. Vaisman, E. Segal, G. Rechavi, U. Alon, G. B. Mills, E. Domany and Y. Yarden (2007). "A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling." Nat Genet **39**(4): 503-512.

Appleford, P. J., M. Griffiths, S. Y. Yao, A. M. Ng, E. G. Chomey, R. E. Isaac, D. Coates, I. A. Hope, C. E. Cass, J. D. Young and S. A. Baldwin (2004). "Functional redundancy of two nucleoside transporters of the ENT family (CeENT1, CeENT2) required for development of *Caenorhabditis elegans*." Mol Membr Biol **21**(4): 247-259.

Aunan, J. R., W. C. Cho and K. Soreide (2017). "The Biology of Aging and Cancer: A Brief Overview of Shared and Divergent Molecular Hallmarks." Aging Dis **8**(5): 628-642.

Austin, J. and J. Kimble (1987). "glp-1 is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*." Cell **51**(4): 589-599.

Bandaru, P., Y. Kondo and J. Kuriyan (2019). "The Interdependent Activation of Son-of-Sevenless and Ras." Cold Spring Harb Perspect Med **9**(2).

Barnes, D. E. and T. Lindahl (2004). "Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells." Annu Rev Genet **38**: 445-476.

Bauer, R., B. Löer, K. Ostrowski, J. Martini, A. Weimbs, H. Lechner and M. Hoch (2005). "Intercellular communication: the *Drosophila* innexin multiprotein family of gap junction proteins." Chem Biol **12**(5): 515-526.

Bell, J. C. (1988). "Oncogenes." Cancer Lett **40**(1): 1-5.

Berben, L., G. Floris, H. Wildiers and S. Hatse (2021). "Cancer and Aging: Two Tightly Interconnected Biological Processes." Cancers (Basel) **13**(6).

Bevans, C. G., M. Kordel, S. K. Rhee and A. L. Harris (1998). "Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules." J Biol Chem **273**(5): 2808-2816.

Beyer, E. C. and V. M. Berthoud (2018). "Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins." Biochim Biophys Acta Biomembr **1860**(1): 5-8.

Biehl, J. K. and B. Russell (2009). "Introduction to stem cell therapy." J Cardiovasc Nurs **24**(2): 98-103; quiz 104-105.

Bischoff, M. and R. Schnabel (2006). "Global cell sorting is mediated by local cell-cell interactions in the *C. elegans* embryo." Dev Biol **294**(2): 432-444.

Bookstein, R. and D. C. Allred (1993). "Recessive oncogenes." Cancer **71**(3 Suppl): 1179-1186.

Bossinger, O. and E. Schierenberg (1996). "The use of fluorescent marker dyes for studying intercellular communication in nematode embryos." Int J Dev Biol **40**(1): 431-439.

Boutry, J., S. Tissot, B. Ujvari, J. P. Capp, M. Giraudeau, A. M. Nedelcu and F. Thomas (2022). "The evolution and ecology of benign tumors." Biochim Biophys Acta Rev Cancer **1877**(1): 188643.

Bouvier, D., G. Spagnol, S. Chenavas, F. Kieken, H. Vitrac, S. Brownell, A. Kellezi, V. Forge and P. L. Sorgen (2009). "Characterization of the structure and intermolecular interactions between the connexin40 and connexin43 carboxyl-terminal and cytoplasmic loop domains." J Biol Chem **284**(49): 34257-34271.

Brenner, S. (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." Genetics **77**(1): 71-94.

Burnell, A. M., K. Houthoofd, K. O'Hanlon and J. R. Vanfleteren (2005). "Alternate metabolism during the dauer stage of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Exp Gerontol **40**(11): 850-856.

Byrd, D. T. and J. Kimble (2009). "Scratching the niche that controls *Caenorhabditis elegans* germline stem cells." Semin Cell Dev Biol **20**(9): 1107-1113.

Byrd, D. T., K. Knobel, K. Affeldt, S. L. Crittenden and J. Kimble (2014). "A DTC niche plexus surrounds the germline stem cell pool in *Caenorhabditis elegans*." PLoS One **9**(2): e88372.

Cai, J., H. Chen, S. Xie, Z. Hu and Y. Bai (2022). "Research Progress of Totipotent Stem Cells." Stem Cells Dev **31**(13-14): 335-345.

Chaffey, N. (2003). Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th edn. Ann Bot. **91**: 401.

Chatterjee, N. and T. G. Bivona (2019). "Polytherapy and Targeted Cancer Drug Resistance." Trends Cancer **5**(3): 170-182.

Chi, C., D. Ronai, M. T. Than, C. J. Walker, A. K. Sewell and M. Han (2016). "Nucleotide levels regulate germline proliferation through modulating GLP-1/Notch signaling in *C. elegans*." Genes Dev **30**(3): 307-320.

Church, D. L., K. L. Guan and E. J. Lambie (1995). "Three genes of the MAP kinase cascade, mek-2, mpk-1/sur-1 and let-60 ras, are required for meiotic cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans*." Development **121**(8): 2525-2535.

Ciccia, A. and S. J. Elledge (2010). "The DNA damage response: making it safe to play with knives." Mol Cell **40**(2): 179-204.

Cinquin, A., M. Chiang, A. Paz, S. Hallman, O. Yuan, I. Vysniauskaite, C. C. Fowlkes and O. Cinquin (2016). "Intermittent Stem Cell Cycling Balances Self-Renewal and Senescence of the *C. elegans* Germ Line." PLoS Genet **12**(4): e1005985.

Cinquin, O., S. L. Crittenden, D. E. Morgan and J. Kimble (2010). "Progression from a stem cell-like state to early differentiation in the *C. elegans* germ line." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(5): 2048-2053.

Citri, A. and Y. Yarden (2006). "EGF-ERBB signalling: towards the systems level." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(7): 505-516.

Clark, W. H. (1991). "Tumour progression and the nature of cancer." Br J Cancer **64**(4): 631-644.

Coghlin, C. and G. I. Murray (2010). "Current and emerging concepts in tumour metastasis." J Pathol **222**(1): 1-15.

Coley, H. M. (2008). "Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer." Cancer Treat Rev **34**(4): 378-390.

Condic, M. L. (2014). "Totipotency: what it is and what it is not." Stem Cells Dev **23**(8): 796-812.

Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Development and Causes of Cancer. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>

Corsi, A. K., B. Wightman and M. Chalfie (2015). "A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*." Genetics **200**(2): 387-407.

Cotrina, M. L., J. H. Lin, A. Alves-Rodrigues, S. Liu, J. Li, H. Azmi-Ghadimi, J. Kang, C. C. Naus and M. Nedergaard (1998). "Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15735-15740.

Crittenden, S. L., C. R. Eckmann, L. Wang, D. S. Bernstein, M. Wickens and J. Kimble (2003). "Regulation of the mitosis/meiosis decision in the *Caenorhabditis elegans* germline." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1436): 1359-1362.

Crittenden, S. L., K. A. Leonhard, D. T. Byrd and J. Kimble (2006). "Cellular analyses of the mitotic region in the *Caenorhabditis elegans* adult germ line." Mol Biol Cell **17**(7): 3051-3061.

Crittenden, S. L., E. R. Troemel, T. C. Evans and J. Kimble (1994). "GLP-1 is localized to the mitotic region of the *C. elegans* germ line." Development **120**(10): 2901-2911.

Culetto, E. and D. B. Sattelle (2000). "A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes." Hum Mol Genet **9**(6): 869-877.

Davies, M. A. and Y. Samuels (2010). "Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma." Oncogene **29**(41): 5545-5555.

DeBerardinis, R. J., J. J. Lum, G. Hatzivassiliou and C. B. Thompson (2008). "The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation." Cell Metab **7**(1): 11-20.

DePina, A. S., W. B. Iser, S. S. Park, S. Maudsley, M. A. Wilson and C. A. Wolkow (2011). "Regulation of *Caenorhabditis elegans* vitellogenesis by DAF-2/IIS through separable transcriptional and posttranscriptional mechanisms." BMC Physiol **11**: 11.

Depriest, A., P. Phelan and I. Martha Skerrett (2011). "Tryptophan scanning mutagenesis of the first transmembrane domain of the innexin Shaking-B(Lethal)." Biophys J **101**(10): 2408-2416.

Dohlman, H. G. and S. L. Campbell (2019). "Regulation of large and small G proteins by ubiquitination." J Biol Chem **294**(49): 18613-18623.

Drummond-Barbosa, D. and A. C. Spradling (2001). "Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during Drosophila oogenesis." Dev Biol **231**(1): 265-278.

Dunn, C. A., V. Su, A. F. Lau and P. D. Lampe (2012). "Activation of Akt, not connexin 43 protein ubiquitination, regulates gap junction stability." J Biol Chem **287**(4): 2600-2607.

Edmonds, J. W., S. L. McKinney, J. K. Prasain and M. A. Miller (2011). "The gap junctional protein INX-14 functions in oocyte precursors to promote C. elegans sperm guidance." Dev Biol **359**(1): 47-58.

Ellis, L. M. and D. A. Reardon (2009). "Cancer: The nuances of therapy." Nature **458**(7236): 290-292.

Epstein, M. L. and N. B. Gilula (1977). "A study of communication specificity between cells in culture." J Cell Biol **75**(3): 769-787.

Evans, E. A., W. C. Chen and M. W. Tan (2008). "The DAF-2 insulin-like signaling pathway independently regulates aging and immunity in C. elegans." Aging Cell **7**(6): 879-893.

Ezcurra, M., A. Benedetto, T. Sornda, A. F. Gilliat, C. Au, Q. Zhang, S. van Schelt, A. L. Petrache, H. Wang, Y. de la Guardia, S. Bar-Nun, E. Tyler, M. J. Wakelam and D. Gems (2018). "C. elegans Eats Its Own Intestine to Make Yolk Leading to Multiple Senescent Pathologies." Curr Biol **28**(16): 2544-2556.e2545.

Fares, H. and I. Greenwald (2001). "Regulation of endocytosis by CUP-5, the Caenorhabditis elegans mucolipin-1 homolog." Nat Genet **28**(1): 64-68.

Feinberg, E. H. and C. P. Hunter (2003). "Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1." Science **301**(5639): 1545-1547.

Fitzgerald, K. and I. Greenwald (1995). "Interchangeability of Caenorhabditis elegans DSL proteins and intrinsic signalling activity of their extracellular domains in vivo." Development **121**(12): 4275-4282.

Francis, K. and B. O. Palsson (1997). "Effective intercellular communication distances are determined by the relative time constants for cyto/chemokine secretion and diffusion." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12258-12262.

Friedberg, E. C., A. Aguilera, M. Gellert, P. C. Hanawalt, J. B. Hays, A. R. Lehmann, T. Lindahl, N. Lowndes, A. Sarasin and R. D. Wood (2006). "DNA repair: from molecular mechanism to human disease." DNA Repair (Amst) **5**(8): 986-996.

Fukuyama, M., A. E. Rougvie and J. H. Rothman (2006). "C. elegans DAF-18/PTEN mediates nutrient-dependent arrest of cell cycle and growth in the germline." Curr Biol **16**(8): 773-779.

Gao, D. and J. Kimble (1995). "APX-1 can substitute for its homolog LAG-2 to direct cell interactions throughout Caenorhabditis elegans development." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9839-9842.

Gems, D. and D. L. Riddle (2000). "Defining wild-type life span in Caenorhabditis elegans." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **55**(5): B215-219.

Goldstein, J. L., M. S. Brown, R. G. Anderson, D. W. Russell and W. J. Schneider (1985). "Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system." Annu Rev Cell Biol **1**: 1-39.

Goodenough, D. A., J. A. Goliger and D. L. Paul (1996). "Connexins, connexons, and intercellular communication." Annu Rev Biochem **65**: 475-502.

Goodenough, D. A. and D. L. Paul (2003). "Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(4): 285-294.

Goodenough, D. A. and D. L. Paul (2009). "Gap junctions." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(1): a002576.

Govindan, J. A., H. Cheng, J. E. Harris and D. Greenstein (2006). "Galphao/i and Galphas signaling function in parallel with the MSP/Eph receptor to control meiotic diapause in C. elegans." Curr Biol **16**(13): 1257-1268.

Grant, B. and I. Greenwald (1997). "Structure, function, and expression of SEL-1, a negative regulator of LIN-12 and GLP-1 in C. elegans." Development **124**(3): 637-644.

Grant, B. and D. Hirsh (1999). "Receptor-mediated endocytosis in the Caenorhabditis elegans oocyte." Mol Biol Cell **10**(12): 4311-4326.

Guo, Y. J., W. W. Pan, S. B. Liu, Z. F. Shen, Y. Xu and L. L. Hu (2020). "ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis." Exp Ther Med **19**(3): 1997-2007.

Hall, D. H. (2017). "Gap junctions in C. elegans: Their roles in behavior and development." Dev Neurobiol **77**(5): 587-596.

Hall, D. H. (2018). "Wormatlas."

Hall, D. H., V. P. Winfrey, G. Blaeuer, L. H. Hoffman, T. Furuta, K. L. Rose, O. Hobert and D. Greenstein (1999). "Ultrastructural features of the adult hermaphrodite gonad of *Caenorhabditis elegans*: relations between the germ line and soma." Dev Biol **212**(1): 101-123.

Han, M., A. Golden, Y. Han and P. W. Sternberg (1993). "C. elegans lin-45 raf gene participates in let-60 ras-stimulated vulval differentiation." Nature **363**(6425): 133-140.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Hansen, D., L. Wilson-Berry, T. Dang and T. Schedl (2004). "Control of the proliferation versus meiotic development decision in the C. elegans germline through regulation of GLD-1 protein accumulation." Development **131**(1): 93-104.

Harper, J. W. and S. J. Elledge (2007). "The DNA damage response: ten years after." Mol Cell **28**(5): 739-745.

Harris, A. L. (2001). "Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap." Q Rev Biophys **34**(3): 325-472.

Hart, A. H., R. Reventar and A. Bernstein (2000). "Genetic analysis of ETS genes in C. elegans." Oncogene **19**(55): 6400-6408.

Henderson, S. T., D. Gao, E. J. Lambie and J. Kimble (1994). "lag-2 may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of C. elegans." Development **120**(10): 2913-2924.

Hertzberg, E. L., T. S. Lawrence and N. B. Gilula (1981). "Gap junctional communication." Annu Rev Physiol **43**: 479-491.

Hodge, F., V. Bajuszova and P. van Oosten-Hawle (2022). "The Intestine as a Lifespan- and Proteostasis-Promoting Signaling Tissue." Front Aging **3**: 897741.

Hsin, H. and C. Kenyon (1999). "Signals from the reproductive system regulate the lifespan of C. elegans." Nature **399**(6734): 362-366.

Hsu, P. P. and D. M. Sabatini (2008). "Cancer cell metabolism: Warburg and beyond." Cell **134**(5): 703-707.

Hu, P. J. (2007). "Dauer." WormBook: 1-19.

Hubbard, E. J. and D. Greenstein (2000). "The *Caenorhabditis elegans* gonad: a test tube for cell and developmental biology." Dev Dyn **218**(1): 2-22.

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

Hubbard, E. J. A. and T. Schedl (2019). "Biology of the Caenorhabditis elegans Germline Stem Cell System." Genetics **213**(4): 1145-1188.

Institute of Medicine (US) Committee on Cancer Control in Low- and Middle-Income Countries; Sloan FA, Gelband H, editors. Cancer Control Opportunities in Low- and Middle-Income Countries. Washington (DC): National Academies Press (US); 2007. 2, Cancer Causes and Risk Factors and the Elements of Cancer Control. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54025/>

Issigonis, M., N. Tulina, M. de Cuevas, C. Brawley, L. Sandler and E. Matunis (2009). "JAK-STAT signal inhibition regulates competition in the Drosophila testis stem cell niche." Science **326**(5949): 153-156.

Ivkosic, I., R. Fures, V. Ćosić, N. Mikelin, L. Bulić, D. Dobranić, P. Brlek and D. Primorac (2023). "Unlocking the Potential of Mesenchymal Stem Cells in Gynecology: Where Are We Now?" Journal of Personalized Medicine **13**: 1253.

Jang, S. J., J. M. Gardner and J. Y. Ro (2011). "Diagnostic approach and prognostic factors of cancers." Adv Anat Pathol **18**(2): 165-172.

Jemc, J. C. (2011). "Somatic gonadal cells: The supporting cast for the germline." genesis **49**(10): 753-775.

Jones, R. G. and C. B. Thompson (2009). "Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth." Genes Dev **23**(5): 537-548.

Joyce, C., A. Rayi and A. Kasi (2024). Tumor-Suppressor Genes. StatPearls. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.

Kaletta, T. and M. O. Hengartner (2006). "Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism." Nat Rev Drug Discov **5**(5): 387-398.

Kanemitsu, M. Y., L. W. Loo, S. Simon, A. F. Lau and W. Eckhart (1997). "Tyrosine phosphorylation of connexin 43 by v-Src is mediated by SH2 and SH3 domain interactions." J Biol Chem **272**(36): 22824-22831.

Kanno, S. and J. E. Saffitz (2001). "The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis." Cardiovasc Pathol **10**(4): 169-177.

Katz, W. S., R. J. Hill, T. R. Clandinin and P. W. Sternberg (1995). "Different levels of the C. elegans growth factor LIN-3 promote distinct vulval precursor fates." Cell **82**(2): 297-307.

Kern, C. C., S. Townsend, A. Salzmann, N. B. Rendell, G. W. Taylor, R. M. Comisel, L. C. Foukas, J. Bähler and D. Gems (2021). "C. elegans feed yolk to their young in a form of primitive lactation." Nat Commun **12**(1): 5801.

Keshet, Y. and R. Seger (2010). "The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions." Methods Mol Biol **661**: 3-38.

Kim, S., C. Spike and D. Greenstein (2013). "Control of oocyte growth and meiotic maturation in *Caenorhabditis elegans*." Adv Exp Med Biol **757**: 277-320.

Kimble, J. and S. L. Crittenden (2005). "Germline proliferation and its control." WormBook: 1-14.

Kimble, J. and S. L. Crittenden (2007). "Controls of germline stem cells, entry into meiosis, and the sperm/oocyte decision in *Caenorhabditis elegans*." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 405-433.

Kimble, J. and W. J. Sharrock (1983). "Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **96**(1): 189-196.

Kimble, J. E. and J. G. White (1981). "On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **81**(2): 208-219.

Kolch, W. (2000). "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions." Biochem J **351 Pt 2**(Pt 2): 289-305.

Kontomanolis, E. N., A. Koutras, A. Syllaios, D. Schizas, A. Mastoraki, N. Garmpis, M. Diakosavvas, K. Angelou, G. Tsatsaris, A. Pagkalos, T. Ntounis and Z. Fasoulakis (2020). "Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review." Anticancer Res **40**(11): 6009-6015.

Kopan, R. and M. X. Ilagan (2009). "The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism." Cell **137**(2): 216-233.

Kornfeld, K. (1997). "Vulval development in *Caenorhabditis elegans*." Trends Genet **13**(2): 55-61.

Koval, M., S. A. Molina and J. M. Burt (2014). "Mix and match: investigating heteromeric and heterotypic gap junction channels in model systems and native tissues." FEBS Lett **588**(8): 1193-1204.

Kroemer, G. and J. Pouyssegur (2008). "Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel." Cancer Cell **13**(6): 472-482.

Kwon, T., B. Roux, S. Jo, J. B. Klauda, A. L. Harris and T. A. Bargiello (2012). "Molecular dynamics simulations of the Cx26 hemichannel: insights into voltage-dependent loop-gating." Biophys J **102**(6): 1341-1351.

Lackner, M. R., K. Kornfeld, L. M. Miller, H. R. Horvitz and S. K. Kim (1994). "A MAP kinase homolog, mpk-1, is involved in ras-mediated induction of vulval cell fates in *Caenorhabditis elegans*." Genes Dev **8**(2): 160-173.

Lai, C. H., C. Y. Chou, L. Y. Ch'ang, C. S. Liu and W. Lin (2000). "Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics." Genome Res **10**(5): 703-713.

Laird, D. W. (2006). "Life cycle of connexins in health and disease." Biochem J **394**(Pt 3): 527-543.

Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." Nature **358**(6381): 15-16.

Lanjuin, A. and P. Sengupta (2004). "Specification of chemosensory neuron subtype identities in *Caenorhabditis elegans*." Curr Opin Neurobiol **14**(1): 22-30.

Larijani, B., E. N. Esfahani, P. Amini, B. Nikbin, K. Alimoghaddam, S. Amiri, R. Malekzadeh, N. M. Yazdi, M. Ghodsi, Y. Dowlati, M. A. Sahraian and A. Ghavamzadeh (2012). "Stem cell therapy in treatment of different diseases." Acta Med Iran **50**(2): 79-96.

Lastwika, K. J., C. A. Dunn, J. L. Solan and P. D. Lampe (2019). "Phosphorylation of connexin 43 at MAPK, PKC or CK1 sites each distinctly alter the kinetics of epidermal wound repair." J Cell Sci **132**(18).

Lee, C., E. B. Sorensen, T. R. Lynch and J. Kimble (2016). "C. elegans GLP-1/Notch activates transcription in a probability gradient across the germline stem cell pool." Elife **5**.

Lee, M. H., M. Ohmachi, S. Arur, S. Nayak, R. Francis, D. Church, E. Lambie and T. Schedl (2007). "Multiple functions and dynamic activation of MPK-1 extracellular signal-regulated kinase signaling in *Caenorhabditis elegans* germline development." Genetics **177**(4): 2039-2062.

Leithe, E., M. Mesnil and T. Aasen (2018). "The connexin 43 C-terminus: A tail of many tales." Biochim Biophys Acta Biomembr **1860**(1): 48-64.

Li, L. and T. Xie (2005). "Stem cell niche: structure and function." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 605-631.

Li, S., J. A. Dent and R. Roy (2003). "Regulation of intermuscular electrical coupling by the *Caenorhabditis elegans* innexin *inx-6*." Mol Biol Cell **14**(7): 2630-2644.

Lin, H. (2002). "The stem-cell niche theory: lessons from flies." Nat Rev Genet **3**(12): 931-940.

Lin, K., H. Hsin, N. Libina and C. Kenyon (2001). "Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling." Nat Genet **28**(2): 139-145.

Lints, R. and D. Hall (2005). "WormAtlas Male Handbook - Reproductive System - Germ Line." WormAtlas.

Liu, P., B. Chen and Z. W. Wang (2011). "Gap junctions synchronize action potentials and Ca²⁺ transients in *Caenorhabditis elegans* body wall muscle." J Biol Chem **286**(51): 44285-44293.

Locke, D., S. Bian, H. Li and A. L. Harris (2009). "Post-translational modifications of connexin26 revealed by mass spectrometry." Biochem J **424**(3): 385-398.

Loeb, K. R. and L. A. Loeb (2000). "Significance of multiple mutations in cancer." Carcinogenesis **21**(3): 379-385.

Lopez, A. L., 3rd, J. Chen, H. J. Joo, M. Drake, M. Shidate, C. Kseib and S. Arur (2013). "DAF-2 and ERK couple nutrient availability to meiotic progression during *Caenorhabditis elegans* oogenesis." Dev Cell **27**(2): 227-240.

Lu, Z., R. Z. Luo, Y. Lu, X. Zhang, Q. Yu, S. Khare, S. Kondo, Y. Kondo, Y. Yu, G. B. Mills, W. S. Liao and R. C. Bast, Jr. (2008). "The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells." J Clin Invest **118**(12): 3917-3929.

Magni, M. (2010). Detection of Bacteria, Viruses, Parasites and Fungi: Bioterrorism Prevention.

Martincorena, I. and P. J. Campbell (2015). "Somatic mutation in cancer and normal cells." Science **349**(6255): 1483-1489.

Matthews, H. K., C. Bertoli and R. A. M. de Bruin (2022). "Cell cycle control in cancer." Nat Rev Mol Cell Biol **23**(1): 74-88.

McCarter, J., B. Bartlett, T. Dang and T. Schedl (1997). "Soma-germ cell interactions in *Caenorhabditis elegans*: multiple events of hermaphrodite germline development require the somatic sheath and spermathecal lineages." Dev Biol **181**(2): 121-143.

McDonald, E. R., 3rd and W. S. El-Deiry (2000). "Cell cycle control as a basis for cancer drug development (Review)." Int J Oncol **16**(5): 871-886.

McLachlan, E., Q. Shao, H. L. Wang, S. Langlois and D. W. Laird (2006). "Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis." Cancer Res **66**(20): 9886-9894.

Mello, C. C., J. M. Kramer, D. Stinchcomb and V. Ambros (1991). "Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences." Embo j **10**(12): 3959-3970.

Mesnil, M., S. Crespin, J. L. Avanzo and M. L. Zaidan-Dagli (2005). "Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process." Biochim Biophys Acta **1719**(1-2): 125-145.

Meyer, R. A., D. W. Laird, J. P. Revel and R. G. Johnson (1992). "Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies." J Cell Biol **119**(1): 179-189.

Michaelson, D., D. Z. Korta, Y. Capua and E. J. Hubbard (2010). "Insulin signaling promotes germline proliferation in *C. elegans*." Development **137**(4): 671-680.

Miller, L. M., M. E. Gallegos, B. A. Morisseau and S. K. Kim (1993). "lin-31, a *Caenorhabditis elegans* HNF-3/fork head transcription factor homolog, specifies three alternative cell fates in vulval development." Genes Dev **7**(6): 933-947.

Miller, M. A., V. Q. Nguyen, M. H. Lee, M. Kosinski, T. Schedl, R. M. Caprioli and D. Greenstein (2001). "A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation." Science **291**(5511): 2144-2147.

Mittelbrunn, M. and F. Sánchez-Madrid (2012). "Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(5): 328-335.

Molofsky, A. V., R. Pardal and S. J. Morrison (2004). "Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal." Curr Opin Cell Biol **16**(6): 700-707.

Morgan, D. E., S. L. Crittenden and J. Kimble (2010). "The *C. elegans* adult male germline: stem cells and sexual dimorphism." Dev Biol **346**(2): 204-214.

Morrison, S. J. and J. Kimble (2006). "Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer." Nature **441**(7097): 1068-1074.

Morrison, S. J. and A. C. Spradling (2008). "Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life." Cell **132**(4): 598-611.

Morrison, S. J., D. E. Wright, S. H. Cheshier and I. L. Weissman (1997). "Hematopoietic stem cells: challenges to expectations." Curr Opin Immunol **9**(2): 216-221.

Mosaad, Y. M. (2014). "Hematopoietic stem cells: an overview." Transfus Apher Sci **51**(3): 68-82.

Muñoz-Maldonado, C., Y. Zimmer and M. Medová (2019). "A Comparative Analysis of Individual RAS Mutations in Cancer Biology." Front Oncol **9**: 1088.

Muta, Y., M. Matsuda and M. Imajo (2019). "Divergent Dynamics and Functions of ERK MAP Kinase Signaling in Development, Homeostasis and Cancer: Lessons from Fluorescent Bioimaging." Cancers (Basel) **11**(4).

Nadarajan, S., J. A. Govindan, M. McGovern, E. J. Hubbard and D. Greenstein (2009). "MSP and GLP-1/Notch signaling coordinately regulate actomyosin-dependent cytoplasmic streaming and oocyte growth in *C. elegans*." Development **136**(13): 2223-2234.

Narbonne, P., V. Hyenne, S. Li, J. C. Labbé and R. Roy (2010). "Differential requirements for STRAD in LKB1-dependent functions in *C. elegans*." Development **137**(4): 661-670.

Narbonne, P., P. S. Maddox and J. C. Labbe (2015). "DAF-18/PTEN locally antagonizes insulin signalling to couple germline stem cell proliferation to oocyte needs in *C. elegans*." Development **142**(24): 4230-4241.

Narbonne, P., P. S. Maddox and J. C. Labbe (2017). "DAF-18/PTEN signals through AAK-1/AMPK to inhibit MPK-1/MAPK in feedback control of germline stem cell proliferation." PLoS Genet **13**(4): e1006738.

Narbonne, P. and R. Roy (2006). "Regulation of germline stem cell proliferation downstream of nutrient sensing." Cell Div **1**: 29.

Narbonne, P. and R. Roy (2009). "Caenorhabditis elegans dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival." Nature **457**(7226): 210-214.

Nielsen, M. S., L. N. Axelsen, P. L. Sorgen, V. Verma, M. Delmar and N. H. Holstein-Rathlou (2012). "Gap junctions." Compr Physiol **2**(3): 1981-2035.

O'Neill, E. and W. Kolch (2004). "Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway." Br J Cancer **90**(2): 283-288.

Orgel, L. E. (1963). "The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing." Proc Natl Acad Sci U S A **49**: 517-521.

Oshima, A., T. Matsuzawa, K. Murata, K. Tani and Y. Fujiyoshi (2016). "Hexadecameric structure of an invertebrate gap junction channel." Journal of Molecular Biology **428**(6): 1227-1236.

Oshima, A., T. Matsuzawa, K. Nishikawa and Y. Fujiyoshi (2013). "Oligomeric structure and functional characterization of *Caenorhabditis elegans* Innexin-6 gap junction protein." J Biol Chem **288**(15): 10513-10521.

Oshima, A., K. Tani, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi and G. E. Sosinsky (2007). "Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(24): 10034-10039.

Panchin, Y., I. Kelmanson, M. Matz, K. Lukyanov, N. Usman and S. Lukyanov (2000). "A ubiquitous family of putative gap junction molecules." Curr Biol **10**(13): R473-474.

Patel, A. (2020). "Benign vs Malignant Tumors." JAMA Oncol **6**(9): 1488.

Patterson, G. I. and R. W. Padgett (2000). "TGF beta-related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development." Trends Genet **16**(1): 27-33.

Peracchia, C. (2004). "Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin." Biochim Biophys Acta **1662**(1-2): 61-80.

Peracchia, C., X. G. Wang and L. L. Peracchia (2000). "Chemical gating of gap junction channels." Methods **20**(2): 188-195.

Perona, R. (2006). "Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors." Clin Transl Oncol **8**(2): 77-82.

Pesch, Y. Y., V. Dang, M. J. Fairchild, F. Islam, D. Camp, P. Kaur, C. M. Smendziuk, A. Messenberg, R. Carr, C. R. McFarlane, P. Y. Musso, F. Van Petegem and G. Tanentzapf (2022). "Gap junctions mediate discrete regulatory steps during fly spermatogenesis." PLoS Genet **18**(9): e1010417.

Peters, M. A., T. Teramoto, J. Q. White, K. Iwasaki and E. M. Jorgensen (2007). "A calcium wave mediated by gap junctions coordinates a rhythmic behavior in *C. elegans*." Curr Biol **17**(18): 1601-1608.

Phelan, P. (2005). "Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins." Biochim Biophys Acta **1711**(2): 225-245.

- Phelan, P. and T. A. Starich (2001). "Innexins get into the gap." Bioessays **23**(5): 388-396.
- Plotnikov, A., E. Zehorai, S. Procaccia and R. Seger (2011). "The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation." Biochim Biophys Acta **1813**(9): 1619-1633.
- Quintana, E., M. Shackleton, M. S. Sabel, D. R. Fullen, T. M. Johnson and S. J. Morrison (2008). "Efficient tumour formation by single human melanoma cells." Nature **456**(7222): 593-598.
- Ratajczak, M. Z., E. Zuba-Surma, M. Kucia, A. Poniewierska, M. Suszynska and J. Ratajczak (2012). "Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues." Adv Med Sci **57**(1): 1-17.
- Remo, B. F., J. Qu, F. M. Volpicelli, S. Giovannone, D. Shin, J. Lader, F. Y. Liu, J. Zhang, D. S. Lent, G. E. Morley and G. I. Fishman (2011). "Phosphatase-resistant gap junctions inhibit pathological remodeling and prevent arrhythmias." Circ Res **108**(12): 1459-1466.
- Richter, K., K. P. Kiefer, B. A. Grzesik, W. G. Clauss and M. Fronius (2014). "Hydrostatic pressure activates ATP-sensitive K⁺ channels in lung epithelium by ATP release through pannexin and connexin hemichannels." Faseb j **28**(1): 45-55.
- Robinson-Thiewes, S., B. Dufour, P. O. Martel, X. Lechasseur, A. A. D. Brou, V. Roy, Y. Chen, J. Kimble and P. Narbonne (2021). "Non-autonomous regulation of germline stem cell proliferation by somatic MPK-1/MAPK activity in *C. elegans*." Cell Rep **35**(8): 109162.
- Roskoski, R., Jr. (2010). "RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation." Biochem Biophys Res Commun **399**(3): 313-317.
- Russell, J. C., T. K. Kim, A. Noori, G. E. Merrihew, J. E. Robbins, A. Golubeva, K. Wang, M. J. MacCoss and M. Kaeberlein (2020). "Composition of *Caenorhabditis elegans* extracellular vesicles suggests roles in metabolism, immunity, and aging." Geroscience **42**(4): 1133-1145.
- Saez, J. C., V. M. Berthoud, M. C. Branes, A. D. Martinez and E. C. Beyer (2003). "Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions." Physiol Rev **83**(4): 1359-1400.
- Sahai-Hernandez, P., A. Castanieto and T. G. Nystul (2012). "Drosophila models of epithelial stem cells and their niches." Wiley Interdiscip Rev Dev Biol **1**(3): 447-457.
- Sangaletti, R., G. Dahl and L. Bianchi (2014). "Mechanosensitive unpaired innexin channels in *C. elegans* touch neurons." Am J Physiol Cell Physiol **307**(10): C966-977.
- Schafer, K. A. (1998). "The cell cycle: a review." Vet Pathol **35**(6): 461-478.

Schedl, T. (1997). Developmental Genetics of the Germ Line. C. elegans II. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess. Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press Copyright © 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schneider, G., M. Schmidt-Supprian, R. Rad and D. Saur (2017). "Tissue-specific tumorigenesis: context matters." Nature Reviews Cancer **17**(4): 239-253.

Schneider, W. J. (1996). "Vitellogenin receptors: oocyte-specific members of the low-density lipoprotein receptor supergene family." Int Rev Cytol **166**: 103-137.

Schofield, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." Blood Cells **4**(1-2): 7-25.

Schulz, C., C. G. Wood, D. L. Jones, S. I. Tazuke and M. T. Fuller (2002). "Signaling from germ cells mediated by the rhomboid homolog stc organizes encapsulation by somatic support cells." Development **129**(19): 4523-4534.

Schulze, A., K. Lehmann, H. B. Jefferies, M. McMahon and J. Downward (2001). "Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells." Genes Dev **15**(8): 981-994.

Seydoux, G., C. Savage and I. Greenwald (1993). "Isolation and characterization of mutations causing abnormal eversion of the vulva in *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **157**(2): 423-436.

Seydoux, G., T. Schedl and I. Greenwald (1990). "Cell-cell interactions prevent a potential inductive interaction between soma and germline in *C. elegans*." Cell **61**(6): 939-951.

Sharrock, W. J. (1983). "Yolk proteins of *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **96**(1): 182-188.

Shaye, D. D. and I. Greenwald (2011). "OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs." PLoS One **6**(5): e20085.

Shuhaibar, L. C., J. R. Egbert, R. P. Norris, P. D. Lampe, V. O. Nikolaev, M. Thunemann, L. Wen, R. Feil and L. A. Jaffe (2015). "Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(17): 5527-5532.

Simanshu, D. K., D. V. Nissley and F. McCormick (2017). "RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease." Cell **170**(1): 17-33.

Simon, A. M., D. A. Goodenough, E. Li and D. L. Paul (1997). "Female infertility in mice lacking connexin 37." Nature **385**(6616): 525-529.

Simonsen, K. T., D. G. Moerman and C. C. Naus (2014). "Gap junctions in *C. elegans*." Front Physiol **5**: 40.

Singh, S. R. (2012). "Stem cell niche in tissue homeostasis, aging and cancer." Curr Med Chem **19**(35): 5965-5974.

Sinyuk, M., E. E. Mulkearns-Hubert, O. Reizes and J. Lathia (2018). "Cancer Connectors: Connexins, Gap Junctions, and Communication." Front Oncol **8**: 646.

Skerrett, I. M. and J. B. Williams (2017). "A structural and functional comparison of gap junction channels composed of connexins and innexins." Dev Neurobiol **77**(5): 522-547.

Skoric, T., M. Korsic, K. Zarkovic, V. Plavsic, N. Besenski, L. Breskovac, Z. Giljevic and J. Paladino (1999). "Clinical and morphological features of undifferentiated monomorphous GH/TSH-secreting pituitary adenoma." European Journal of Endocrinology **140**(6): 528-537.

Smendziuk, C. M., A. Messenberg, A. W. Vogl and G. Tanentzapf (2015). "Bi-directional gap junction-mediated soma-germline communication is essential for spermatogenesis." Development **142**(15): 2598-2609.

Smith, T. D., A. Mohankumar, P. J. Minogue, E. C. Beyer, V. M. Berthoud and M. Koval (2012). "Cytoplasmic amino acids within the membrane interface region influence connexin oligomerization." J Membr Biol **245**(5-6): 221-230.

Sornda, T., M. Ezcurra, C. Kern, E. R. Galimov, C. Au, Y. de la Guardia and D. Gems (2019). "Production of YP170 Vitellogenins Promotes Intestinal Senescence in *Caenorhabditis elegans*." The Journals of Gerontology: Series A **74**(8): 1180-1188.

Spandidos, D. A. (2007). "Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis." J buon **12 Suppl 1**: S9-12.

Spieth, J., M. Nettleton, E. Zucker-Aprison, K. Lea and T. Blumenthal (1991). "Vitellogenin motifs conserved in nematodes and vertebrates." J Mol Evol **32**(5): 429-438.

Starich, T. and D. Greenstein (2020). "A Limited and Diverse Set of Suppressor Mutations Restore Function to INX-8 Mutant Hemichannels in the *Caenorhabditis elegans* Somatic Gonad." Biomolecules **10**(12).

Starich, T., M. Sheehan, J. Jadrich and J. Shaw (2001). "Innexins in *C. elegans*." Cell Commun Adhes **8**(4-6): 311-314.

Starich, T. A., X. Bai and D. Greenstein (2020). "Gap junctions deliver malonyl-CoA from soma to germline to support embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*." Elife **9**.

Starich, T. A., D. H. Hall and D. Greenstein (2014). "Two classes of gap junction channels mediate soma-germline interactions essential for germline proliferation and gametogenesis in *Caenorhabditis elegans*." Genetics **198**(3): 1127-1153.

Starich, T. A., A. Miller, R. L. Nguyen, D. H. Hall and J. E. Shaw (2003). "The *Caenorhabditis elegans* innexin INX-3 is localized to gap junctions and is essential for embryonic development." Dev Biol **256**(2): 403-417.

Starich, T. A., J. Xu, I. M. Skerrett, B. J. Nicholson and J. E. Shaw (2009). "Interactions between innexins UNC-7 and UNC-9 mediate electrical synapse specificity in the *Caenorhabditis elegans* locomotory nervous system." Neural Dev **4**: 16.

Statistique Canada. Tableau 13-10-0394-01 Les principales causes de décès, population totale, selon le groupe d'âge DOI : <https://doi.org/10.25318/1310039401-fra>

Sternberg, P. W. (2005). "Vulval development." WormBook: 1-28.

Stine, Z. E., Z. T. Schug, J. M. Salvino and C. V. Dang (2022). "Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology." Nat Rev Drug Discov **21**(2): 141-162.

Stokoe, D. and F. McCormick (1997). "Activation of c-Raf-1 by Ras and Src through different mechanisms: activation in vivo and in vitro." Embo j **16**(9): 2384-2396.

Stout, C. E., J. L. Costantin, C. C. Naus and A. C. Charles (2002). "Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels." J Biol Chem **277**(12): 10482-10488.

Sukoyan, M. A., S. Y. Vatolin, A. N. Golubitsa, A. I. Zhelezova, L. A. Semenova and O. L. Serov (1993). "Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies." Mol Reprod Dev **36**(2): 148-158.

Swietach, P. and S. Monterisi (2019). "A Barter Economy in Tumors: Exchanging Metabolites through Gap Junctions." Cancers (Basel) **11**(1).

Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.

Tan, P. B., M. R. Lackner and S. K. Kim (1998). "MAP kinase signaling specificity mediated by the LIN-1 Ets/LIN-31 WH transcription factor complex during C. elegans vulval induction." Cell **93**(4): 569-580.

Terrell, E. M. and D. K. Morrison (2019). "Ras-Mediated Activation of the Raf Family Kinases." Cold Spring Harb Perspect Med **9**(1).

ThermoFisher Scientific. (2006-2023). "Hoechst 33342." Retrieved March 3, 2023, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/H3570>.

Todd, R. and D. T. Wong (1999). "Oncogenes." Anticancer Res **19**(6a): 4729-4746.

Tolkin, T., A. Mohammad, T. A. Starich, K. C. Q. Nguyen, D. H. Hall, T. Schedl, E. J. A. Hubbard and D. Greenstein (2022). "Innexin function dictates the spatial relationship between distal somatic cells in the Caenorhabditis elegans gonad without impacting the germline stem cell pool." Elife **11**.

Uno, M. and E. Nishida (2016). "Lifespan-regulating genes in C. elegans." NPJ Aging Mech Dis **2**: 16010.

Unwin, P. N. and G. Zampighi (1980). "Structure of the junction between communicating cells." Nature **283**(5747): 545-549.

Valet, M. and P. Narbonne (2022). "Formation of benign tumors by stem cell deregulation." PLoS Genet **18**(10): e1010434.

Vandamme, D., A. Herrero, F. Al-Mulla and W. Kolch (2014). "Regulation of the MAPK pathway by raf kinase inhibitory protein." Crit Rev Oncog **19**(6): 405-415.

Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele and Z. N. Berneman (2003). "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer." Cell Prolif **36**(3): 131-149.

Viallet, J. and J. D. Minna (1990). "Dominant oncogenes and tumor suppressor genes in the pathogenesis of lung cancer." Am J Respir Cell Mol Biol **2**(3): 225-232.

Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (1993). "The multistep nature of cancer." Trends Genet **9**(4): 138-141.

Voog, J. and D. L. Jones (2010). "Stem cells and the niche: a dynamic duo." Cell Stem Cell **6**(2): 103-115.

Walker, D. S. and W. R. Schafer (2020). "Distinct roles for innexin gap junctions and hemichannels in mechanosensation." Elife **9**.

- Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." Science **123**(3191): 309-314.
- Ward, S. and J. S. Carrel (1979). "Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **73**(2): 304-321.
- Warn-Cramer, B. J., P. D. Lampe, W. E. Kurata, M. Y. Kanemitsu, L. W. Loo, W. Eckhart and A. F. Lau (1996). "Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin-43 gap junction protein." J Biol Chem **271**(7): 3779-3786.
- Watt, F. M. and B. L. Hogan (2000). "Out of Eden: stem cells and their niches." Science **287**(5457): 1427-1430.
- Weinberg, R. A. (1996). "How cancer arises." Sci Am **275**(3): 62-70.
- Weng, S., M. Lauven, T. Schaefer, L. Polontchouk, R. Grover and S. Dhein (2002). "Pharmacological modification of gap junction coupling by an antiarrhythmic peptide via protein kinase C activation." Faseb j **16**(9): 1114-1116.
- White, J. G., E. Southgate, J. N. Thomson and S. Brenner (1986). "The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **314**(1165): 1-340.
- White, T. W. and R. Bruzzone (1996). "Multiple connexin proteins in single intercellular channels: connexin compatibility and functional consequences." J Bioenerg Biomembr **28**(4): 339-350.
- Winston, W. M., C. Molodowitch and C. P. Hunter (2002). "Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1." Science **295**(5564): 2456-2459.
- Wolke, U., E. A. Jezuit and J. R. Priess (2007). "Actin-dependent cytoplasmic streaming in *C. elegans* oogenesis." Development **134**(12): 2227-2236.
- Wolkow, C. and D. Hall (2015). "WormAtlas Dauer Handbook - Introduction to the Dauer Larva - Overview." WormAtlas.
- Wortzel, I. and R. Seger (2011). "The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles." Genes Cancer **2**(3): 195-209.
- Yamashita, Y. M., M. T. Fuller and D. L. Jones (2005). "Signaling in stem cell niches: lessons from the *Drosophila* germline." J Cell Sci **118**(Pt 4): 665-672.
- Yang, J., G. Qin, M. Luo, J. Chen, Q. Zhang, L. Li, L. Pan and S. Qin (2015). "Reciprocal positive regulation between Cx26 and PI3K/Akt pathway confers acquired gefitinib

resistance in NSCLC cells via GJIC-independent induction of EMT." Cell Death Dis **6**(7): e1829.

Yang, S. and G. Liu (2017). "Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma." Oncol Lett **13**(3): 1041-1047.

Yen, M. R. and M. H. Saier, Jr. (2007). "Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily." Prog Biophys Mol Biol **94**(1-2): 5-14.

Yu, M., C. Zhang, L. Li, S. Dong, N. Zhang and X. Tong (2014). "Cx43 reverses the resistance of A549 lung adenocarcinoma cells to cisplatin by inhibiting EMT." Oncol Rep **31**(6): 2751-2758.

Zakrzewski, W., M. Dobrzyński, M. Szymonowicz and Z. Rybak (2019). "Stem cells: past, present, and future." Stem Cell Res Ther **10**(1): 68.

Zhai, C., N. Zhang, X. X. Li, X. Chen, F. Sun and M. Q. Dong (2022). "Fusion and expansion of vitellogenin vesicles during *Caenorhabditis elegans* intestinal senescence." Aging Cell **21**(11): e13719.

Zhang, N., L. A. Khan, E. Membreno, G. Jafari, S. Yan, H. Zhang and V. Gobel (2017). "The *C. elegans* Intestine As a Model for Intercellular Lumen Morphogenesis and In Vivo Polarized Membrane Biogenesis at the Single-cell Level: Labeling by Antibody Staining, RNAi Loss-of-function Analysis and Imaging." J Vis Exp(128).

Zhang, X., Y. Wang, Z. Cai, Z. Wan, Y. Aihemaiti and H. Tu (2023). "A gonadal gap junction INX-14/Notch GLP-1 signaling axis suppresses gut defense through an intestinal lysosome pathway." Front Immunol **14**: 1249436.

Zhou, M., M. Zheng, X. Zhou, S. Tian, X. Yang, Y. Ning, Y. Li and S. Zhang (2023). "The roles of connexins and gap junctions in the progression of cancer." Cell Commun Signal **21**(1): 8.