

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

**RÉGULATION DE L'HOMÉOSTASIE PROLIFÉRATIVE DES CELLULES SOUCHES
GERMINALES DE *CÆNORHABDITIS ELEGANS* PAR LES VOIES P38 ET JNK MAP
KINASE**

**THÈSE PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE DU
DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE**

**PAR
ALEXANDRE CLOUET**

MARS 2026

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.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (DOCTORAT)

Direction de recherche :

Patrick Narbonne	Directeur de recherche
------------------	------------------------

Jury d'évaluation

Patrick Narbonne	Directeur de recherche
------------------	------------------------

Erwan Pernet	Évaluateur interne, président du jury
--------------	---------------------------------------

Yannick Audet-Delage	Évaluateur interne
----------------------	--------------------

J Alex Parker	Évaluateur externe
---------------	--------------------

REMERCIEMENTS

Je souhaite avant tout remercier le professeur Patrick Narbonne pour m'avoir accueilli dans son jeune laboratoire et sans qui cette thèse n'aurait pas pu être réalisée. Patrick, je te remercie pour le projet de recherche que tu m'as confié, la liberté que tu m'as accordée dans mon travail et les opportunités de présenter mes résultats dans des conférences internationales (je pense qu'on ne te le dit pas assez). Merci d'avoir fait preuve de la plus grande rigueur en relisant mes résumés, mes demandes de bourses et mes manuscrits et pour tes encouragements dans le processus de recherche, de rédaction et de soumission. Enfin, merci pour les moments que l'on a partagés hors du laboratoire au cours de ces cinq dernières années, et d'avoir pensé à ma forme physique en me faisant faire un nombre ahurissant de pompes, abdos et squats en tous genres après mes (trop nombreuses) défaites au frisbee, à la pétanque et aux pichenottes.

J'exprime également ma reconnaissance aux docteurs Anne Pélissier-Monier, Caroline Badouel, Gaëlle Lebreton, Julie Batut et Laetitia Bataillé pour leur encadrement au baccalauréat et à la maîtrise. Je ne serais pas le scientifique que je suis aujourd'hui sans vos méthodes, votre passion et votre rigueur.

Merci/Thank you aux autres étudiant(e)s de l'équipe de Patrick : Armi Chaudhari, Audrey Tremblay⁷, Aurélia Condomat, Jichao Deng, Lloyd Fotso, Matthieu Valet, Orphélia Ngalle Bibebe, Pier-Olivier Martel, Rustelle Janse Van Vuuren et Xavier Lechasseur pour votre aide, les discussions scientifiques passionnantes et les bons moments au laboratoire ou en conférence. Merci à Lloyd, Pier-Olivier et Xavier pour nos rencontres culinaires en dehors du laboratoire, je me suis régalé en votre compagnie. Merci à Xavier pour tous les moments que nous avons partagés à l'extérieur du labo, et pour avoir enrichi ma culture cinématographique et musicale.

Merci/Danke aux stagiaires que j'ai mentoré(e)s, Alexane Murray, Aurélia Condomat, Kerene Kimpembe, Janina Rieger et Yassir Haoubi. J'espère que je vous ai été aussi utile que vous l'avez été pour moi.

Merci à la professeure Maria-Grazia Martinoli pour notre collaboration fructueuse et pour vos encouragements. Merci aux professeurs du département de biologie médicale, ainsi qu'aux professeurs Hugo Germain et Isabelle Desgagné-Pénix pour les discussions scientifiques et le prêt de leurs équipements.

Je clos mes remerciements scientifiques en exprimant ma gratitude aux professeures Claire Bénard et Geneviève Pépin, pour avoir évalué mon examen prédoctoral, ainsi qu'aux professeurs J Alex Parker, Erwan Pernet et Yannick Audet-Delage qui ont accepté de consacrer leur temps à l'évaluation de ma thèse.

Merci à mes amis duellistes, Andrew Diamond, Clément De Boisseuil et Nicolas Sene, qui ont enduré le mauvais perdant que je suis beaucoup trop longtemps. Merci pour la bonne nourriture, les instants de partage et votre présence quand j'en avais besoin.

Merci à mes ami(e)s français(e)s. Anne-Sophie Averty, tu as toujours été encourageante et bienveillante avec moi. Claire Letanneur, tu m'as soutenu dans des moments difficiles et tu m'as beaucoup appris sur la communication scientifique. Théo Devèze, merci pour nos discussions (toujours très instructives), ton soutien, et pour tous ces bons repas !

Dhanyavaad Snehiji, you were a sunshine in Canada's long and cold winters. I had so many good moments with you, cooking, discussing while holding a hot chocolate and playing badminton.

Merci à Serge Nouemssi, Claudine Ndoli, Kéziah Nouemssi et Georges Fangué pour les bons moments, notamment cette soirée au bowling à Noël qui m'a fait du bien au moral.

Merci/DhanyavaadGracias/Obrigado/Thank you à mes ami(e)s Ambica Bora, Audrey Bergeron, Léa Combres, Maribel Diaz Garza, Mario Sanchez Moreno, Ingrid Sanchez, Pamela Lavoie, Raphael Boucher, Rohith Grandhi, Sneha Hegde, Tiago Silva Oliveira, Valentin Clédassou et Valeria Parra pour tous les bons moments que nous avons partagés au labo, et en dehors.

Merci à mes amis québécois Jean-François, Vincent et Éric, un des rares autres fans trifluviens d'Amenra.

J'aimerais maintenant remercier ma famille. Olivier Clouet et Valérie Causse, mes deux parents, qui m'ont transmis de belles valeurs. Je n'aurais pas pu en arriver à ce niveau sans votre confiance et votre soutien. On dit que la pomme ne tombe jamais loin de l'arbre et je suis fier d'être votre fils. Je sais que vous êtes tout autant fiers de moi, et j'espère que vous continuerez de l'être. Benjamin Clouet, mon petit frère, tu peux être fier du chemin que tu as parcouru, ne baisse pas les bras. Je suis toujours heureux de regarder une série ou un film, d'aller au musée ou d'échanger des répliques de sketchs de François Damiens ou du Royaume avec toi. Mon grand-père, Francis Clouet, ma grand-mère, Christiane Dulac, et mon arrière-grand-mère, Katharina Hübinger. Je suis heureux d'avoir grandi et partagé de beaux moments avec vous. Vous m'avez beaucoup appris, et vous me guidez chaque jour.

Je remercie également ma belle-famille, Sandrine Nicolaon, Shanel et Éléa Marquigny ainsi que Junior. Je suis heureux de vous retrouver tous les ans et d'avoir pu partager de belles parenthèses dans mes études avec vous.

Et bien sûr, je remercie ma famille Québécoise, Xavier Lechasseur, Cathie Garand, Augustine et Eugène Lechasseur, Simon et Madeleine Cossette, et Jean-Yves Lechasseur. Vous m'avez accueilli à tant de reprises, et je vous en serai toujours reconnaissant. Vous m'avez aidé à me sentir chez moi, si loin de chez moi.

RÉSUMÉ

Les cellules souches génèrent les cellules différenciées nécessaires pour assurer la fonction et l'homéostasie des tissus et des organes. La prolifération des cellules souches doit être régulée de manière précise et dynamique pour éviter l'apparition de défauts développementaux ou de pathologies comme le cancer. Dans les *C. elegans* hermaphrodites adultes, le taux de prolifération des cellules souches germinales (CSG) est régulé par deux facteurs : la prise alimentaire et la quantité d'ovocytes matures. En présence de sperme, les CSG prolifèrent pour produire rapidement de nouveaux ovocytes, disponibles pour la fécondation. Quand les spermatozoïdes sont absents, ou lorsque les ovocytes ne peuvent être fécondés, l'ovulation est réprimée et les ovocytes s'accumulent tandis que la mise en quiescence des CSG est favorisée pour empêcher la suraccumulation des ovocytes. Ce rétrocontrôle homéostatique nécessite d'intégrer l'abondance des ovocytes et d'émettre un signal à travers plusieurs types cellulaires pour moduler la prolifération des CSG. Nous savons que la signalisation homéostatique doit inhiber MPK-1/ERK, qui agit dans l'intestin et la gonade somatique pour promouvoir la prolifération des CSG. Au cours d'un crible génétique sens, nous avons isolé deux allèles perte-de-fonction de *tir-1*/SARM1 qui aboutissent à une suraccumulation de cellules germinales différenciées dans le fond génétique *oma-1*; *oma-2*, dans lequel l'activation des ovocytes ne peut se produire. Nous avons ciblé tous les interacteurs connus de *tir-1* en utilisant des ARN interférents (ARNi) et/ou des allèles, et nous avons impliqué le module de réponse aux stress conservé NSY-1/MAP3K5, 6, 15 → SEK-1/MAP2K3, 6 → PMK-1/MAPK11 à 14, homologue à la signalisation p38 MAPK, dans la mise en quiescence homéostatique des CSG. En outre, la pseudokinase NIPI-3/TRIB1, activatrice de la signalisation *pmk-1/p38*, empêche la suraccumulation de cellules germinales différenciées dans le

fond génétique *oma-1, 2*. En plus de l'expression précédemment décrite dans l'intestin, les neurones et l'hypoderme, nous avons observé que PMK-1 est présente dans la gonade somatique, incluant les cellules de la gaine gonadique et la spermathèque. Des approches classiques de sauvetage phénotypique utilisant des promoteurs spécifiques de l'intestin (*ges-1*), des neurones (*unc-119*), des cellules de la gaine (*lim-7*) et de la spermathèque (*fos-1*) ont révélé que l'activité de *sek-1* dans la gaine gonadique est suffisante pour restaurer l'inhibition homéostatique de la prolifération des CSG. De plus, nos analyses épistatiques suggèrent que la voie PMK-1/p38 agit en amont de MPK-1 dans la signalisation homéostatique. Nos résultats vont de pair avec un modèle où l'accumulation d'ovocytes déclenche une réponse au stress dépendante de PMK-1 dans la gaine gonadique, qui aboutit à l'inhibition homéostatique de MPK-1, et ainsi de la prolifération des CSG. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que le module JNK MAPK conservé MLK-1/MAP3K9 à 11 → MEK-1/MAP2K7 → KGB-1, 2/MAPK10, 9 empêche la suraccumulation de cellules germinales différenciées dans le fond génétique *oma-1, 2* et que KGB-1, 2 favorise la mise en quiescence des CSG dans un fond génétique féminisé. Nous mettons ainsi en évidence un nouveau rôle pour TIR-1, PMK-1/p38 MAPK, KGB-1, 2/JNK MAPK et NIPI-3/TRIB1. S'il est conservé, ce phénomène pourrait être à la base de la régulation homéostatique de divers types de cellules souches dans d'autres espèces. Sa perturbation pourrait mener à une prolifération excessive et à la tumorigenèse.

Mots-clefs : *C. elegans*, cellules souches germinales, KGB-1/JNK MAPK, NIPI-3/TRIB1, PMK-1/P38 MAPK, prolifération, régulation homéostatique, stress, suppresseur de tumeurs, TIR-1/SARM.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	v
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	xiv
NOMENCLATURE	xvii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES UTILISÉS	xviii
CHAPITRE I – Introduction	1
1. Les cellules souches	1
2. <i>C. elegans</i> est un organisme modèle permettant d'étudier les CS <i>in vivo</i>	3
2.1. L'utilisation de <i>C. elegans</i> a de nombreux avantages	3
2.2. Le cycle de vie de <i>C. elegans</i>	4
2.3. <i>C. elegans</i> est utilisé comme modèle dans de nombreux domaines en recherche.	5
3. Dimorphisme et déterminisme sexuel de <i>C. elegans</i>	6
3.1. Le dimorphisme sexuel	6
3.2. Le mécanisme global du déterminisme sexuel de <i>C. elegans</i>	8
3.2.1. Compensation de doses et déterminisme sexuel	9
3.2.2. HER-1 contrôle le déterminisme sexuel de manière cellulaire non-autonome en levant l'inhibition des protéines FEM	9
3.2.3. Le régulateur terminal TRA-1 détermine l'identité sexuelle dans les cellules somatiques	

.....	10
3.3. Le mécanisme germinale du déterminisme sexuel	10
3.3.1. Le déterminisme sexuel dans la lignée germinale requiert les protéines FEM et FOG	10
3.3.2. Des modules de régulation permettent de favoriser la spermatogenèse de manière transitoire dans les hermaphrodites.	11
3.3.2A – La traduction de l'ARNm <i>tra-2</i> est temporairement inhibée par GLD-1 et FOG-2 durant la spermatogenèse.	12
3.3.2B – La régulation dynamique de la traduction du transcrit <i>fem-3</i> permet d'assurer la spermatogenèse ou d'effectuer la transition vers l'ovogenèse	13
3.3.2C – L'inhibition de la traduction de <i>fem-3</i> par les FBF, NOS-3 et les MOG permet de favoriser l'ovogenèse	13
4. Développement des gonades et organisation de la méiose chez les <i>C. elegans</i> hermaphrodites	16
4.1. Développement des gonades au cours des stades larvaires et gamétogenèse	16
4.2. Organisation spatiale de la prophase I de méiose dans la gonade des hermaphrodites adultes	18
4.2.1. Zone de transition, stades leptotène et zygotène : appariement et formation des axes des chromosomes.....	18
4.2.2. En amont du coude, stade pachytène : assemblage du complexe synaptonémal et enjambement.	20
4.2.3. Après le coude, stades diplotène et diakinèse : différenciation des bivalents.	22
5. Croissance, maturation et ovulation des ovocytes	23

5.1. La croissance des ovocytes	23
5.2. La maturation des ovocytes.....	23
5.2.1. Le signal protéine majeure du sperme.....	23
5.2.2. Intégration de la protéine majeure du sperme par les cellules de la gaine gonadique ...	24
5.2.3. Les protéines OMA favorisent la maturation de manière redondante.....	25
5.3. Le contrôle de l'ovulation	26
6. Maintenance de l'identité mitotique des cellules souches germinales chez les <i>C. elegans</i> hermaphrodites	27
6.1. La cellule de l'extrémité distale exprime les ligands pour le récepteur Notch	27
6.2. Le récepteur GLP-1 est exprimé à la surface des cellules souches germinales	28
6.3. La voie Notch active la transcription de LST-1 et SYGL-1 dans les cellules souches germinales	29
6.4. LST-1 et SYGL-1 agissent de concert avec FBF-1 et FBF-2 pour maintenir la prolifération et inhiber l'entrée en méiose des cellules souches germinales.....	30
6.5. Les branches GLD-1, GLD-2 et SCF ^{PROM-1} favorisent l'entrée en méiose de manière partiellement redondante	31
6.5.1. La branche GLD-1/NOS-3	31
6.5.2. La branche GLD-2/GLD-3	34
6.5.3. La branche SCF ^{PROM-1}	34
7. Contrôle du taux de prolifération des cellules souches germinales chez l'hermaphrodite adulte	36
7.1. Régulation de la prolifération des cellules souches germinales par des facteurs systémiques	36

7.2. Régulation de l'homéostasie proliférative des cellules souches germinales.....	38
8. Hypothèse et objectifs du travail de recherche	44
CHAPITRE II – Non-autonomous PMK-1/p38 MAPK signaling	
ensures homeostatic downregulation of germline stem cell proliferation	
in <i>C. elegans</i>	49
Summary and keywords	50
Introduction	51
Results	53
A forward genetic screen to identify germline homeostasis-defective mutants	53
TIR-1/SARM1 prevents the formation of differentiated germline tumors	54
Canonical <i>pmk-1</i> /p38 MAPK signaling is required for homeostatic inhibition of GSC proliferation.....	55
PMK-1/p38 signaling inhibits gonadal sheath MPK-1 to induce GSC quiescence	57
Discussion	60
Acknowledgments	63
Declaration of interests.....	64
Material and methods	64
Figure title and legends	74
References	78
Supplemental information	84
CHAPITRE III – The canonical JNK MAPK signaling regulates germline	
homeostasis in <i>C. elegans</i>	98

Summary and keywords	99
Introduction	100
Results	103
The JNK MAP3K MLK-1 regulates germline homeostasis	103
Discussion	104
Acknowledgments	106
Declaration of interests	106
Material and methods	106
Figure title and legends	112
References	116
Supplemental information	119
CHAPITRE IV – Discussion	123
1. Limitations expérimentales de mon travail de recherche	124
1.1. Limitations liées à l'utilisation de mutations récessives stériles et d'un chromosome balanceur	124
1.2. Limitations liées à l'approche de mutagenèse aléatoire	126
1.3. Limitations de l'approche d'ARNi	129
1.4. Limitations de la quantification de l'indice mitotique	131
2. Implication de TIR-1/SARM1 dans la signalisation germinale homéostatique : un rôle suppresseur de tumeur conservé	132
2.1. La réduction de l'expression de certaines protéines à domaine SAM n'aboutit pas à une suraccumulation de cellules germinales différenciées	133

2.2. La fonction enzymatique de TIR-1 pourrait ne pas être requise pour la signalisation homéostatique	134
2.3. Contribution annexe de TIR-1 à la signalisation homéostatique	135
2.4. Fonction spatiale de TIR-1 dans la signalisation homéostatique	135
2.5. Implication de TIR-1 et de ses homologues dans le contrôle de la prolifération et la cancérologie	137
3. Implication de la signalisation <i>pmk-1/p38</i> dans la signalisation germinale homéostatique.....	138
3.1. NSY-1, SEK-1 et PMK-1 sont moins pléiotropes que les autres effecteurs du rétrocontrôle homéostatique.....	139
3.2. Fonction spatiale de la signalisation <i>pmk-1/p38</i> dans la signalisation homéostatique....	140
3.3. Régulation de la prolifération par la signalisation <i>pmk-1/p38</i> : un mécanisme adaptatif ? ..	142
3.4. Rôle ambivalent de la voie p38 MAPK dans le contrôle de la prolifération et pathologies humaines.....	143
4. Implication d'interacteurs de la signalisation <i>pmk-1/p38</i> dans la signalisation germinale homéostatique.....	145
4.1. UNC-43, ATF-7, SKN-1 et VHP-1 ne semblent pas être impliquées dans la signalisation homéostatique.....	146
4.2. La phosphatase PP2A ne semble pas médier l'inhibition de MPK-1/ERK par PMK-1/p38	146
4.3. NIPI-3/TRIB1 empêche la formation de tumeurs germinales différenciées	147

4.4. Facteurs en amont de NIP1-3, TIR-1 et de la voie p38 MAPK : hypothèse de l'étirement mécanique des cellules de la gaine gonadique	148
5. Implication de la voie JNK MAPK dans la signalisation germinale homéostatique.....	151
5.1. Interaction physique de TIR-1 avec KGB-1.....	151
5.2. Redondance fonctionnelle de KGB-1 et KGB-2.....	152
5.3. Les voies p38 et JNK MAPK ne régulent pas l'homéostasie proliférative des cellules souches germinales de manière redondante	153
5.4. Fonction spatiale de la signalisation <i>kgb-1/JNK</i> dans la régulation des cellules souches germinales et de leur progéniture différenciée	154
5.5. Rôle ambigu de la voie JNK MAPK dans le contrôle de la prolifération cellulaire	156
6. Perspective : étude du phosphoprotéome et de l'interactome des p38 et JNK MAPK.....	159
CHAPITRE V – Conclusion.....	161
Références	163
Annexes	a

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

CHAPITRE I – Introduction

Figure I-1. Les cellules souches peuvent s’auto-renouveler et/ou générer des cellules différenciées.....	2
Figure I-2. Cycle de vie du <i>C. elegans</i> hermaphrodite.....	4
Figure I-3. Dimorphisme sexuel de <i>C. elegans</i>	7
Figure I-4. Réseau de régulation contrôlant le déterminisme sexuel dans la lignée somatique et germinale.....	15
Figure I-5. Développement des gonades hermaphrodites.	17
Figure I-6. Organisation spatiale de la méiose dans les gonades hermaphrodites.....	22
Figure I-7. La cellule de l’extrémité distale maintient l’identité mitotique des cellules souches germinales par le biais de la signalisation Notch.....	33
Figure I-8. La signalisation de l’insuline maintient le taux de prolifération des cellules souches germinales élevé de manière systémique.	38
Figure I-9. La signalisation homéostatique module localement l’activité de MPK-1 pour contrôler le taux de prolifération des cellules souches germinales.	40
Figure I-10. Un rétrocontrôle homéostatique défectueux restaure un taux de prolifération élevé des cellules souches germinales chez les hermaphrodites Fem et Oma.	43
Figure I-11. Les bases moléculaires de la signalisation germinale homéostatique.	44

CHAPITRE II – Non-autonomous PMK-1/p38 MAPK signaling ensures homeostatic downregulation of germline stem cell proliferation in *C. elegans*

Figure 1. A forward genetic screen to isolate germline homeostasis-defective (<i>ghd</i>) mutants.....	74
Figure 2. TIR-1/SARM1 prevents the formation of differentiated germline tumors.	75
Figure 3. Germline homeostasis requires the canonical PMK-1/p38 signaling cascade and the NIP1-3/TRIB1 pseudokinase.	76

Figure 4. PMK-1/p38 signaling non-autonomously promotes GSC quiescence from the gonadal sheath, upstream of MPK-1/ERK.	77
Figure S1. Feminized PMK-1/p38 signaling double mutants accumulate diakinesis oocyte.....	85
Figure S2. Genetic requirement for homeostatic downregulation of GSC proliferation.	86
Figure S3. Insights on the expression patterns of PMK-1::mNG and TIR-1::mNG.	87
Figure S4. Oocyte accumulation is linked to proximal sheath cells stretching.	88
Table S1: RNAi screen of multi-hit candidates identifies <i>tir-1</i> as being implicated in germline homeostatic signaling.	88
Table S2: RNAi screen of <i>tir-1</i> interactors highlights <i>nsy-1</i> and <i>pmk-1</i> as required for homeostatic inhibition of GSC proliferation.	89
Table S3: Plasmid design. Related to material and methods.....	91
Table S4: Strains, alleles, transgenes and rearrangements used in this work. Related to material and methods....	94

CHAPITRE III – The canonical JNK MAPK signaling regulates germline homeostasis in *C. elegans*

Table 1: RNAi screen of JNK MAP kinases in the <i>oma-1, 2</i> background.....	89
Figure 1. MLK-1 prevents the formation of differentiated germline tumors.	112
Figure 2. MEK-1 and KGB-1/2 prevent the formation of differentiated germline tumors.	113
Figure 3. KGB-1/2 is required to suppress GSC proliferation in the absence of sperm.....	115
Table S1: Plasmid design.	120
Table S2: Strains, alleles, transgenes and rearrangements used in this work.	122

CHAPITRE IV – Discussion

Figure D-1. La signalisation p38 MAPK de <i>C. elegans</i>	141
Figure D-2. La signalisation JNK MAPK de <i>C. elegans</i>	153
Figure D-3. Mécanismes proposés : régulation de l'homéostasie des CSG par les voies p38 et JNK MAPK.....	157

ANNEXE

Figure A-1. Effectors of p38 MAPK-mediated regulation of SC proliferation.	1
---	---

Figure A-2. Une délétion de 2,1 kb de *sek-1* n’aboutit pas à l’accumulation significative d’ovocytes au stade diakinèse dans les vers féminisés. o

Figure A-3. UNC-43, ATF-7, SKN-1 et VHP-1 ne semblent pas requises dans la signalisation homéostatique germinale.....p

Tableau A-1: Criblage ARNi, dans le fond génétique *oma-1, 2*, des protéines kinases activées en réponse aux stress q

Tableau A-2 : Criblage ARNi, dans le fond génétique *oma-1, 2*, des gènes requis dans l’intégration de stress mécaniques ou oxydatifs..... r

NOMENCLATURE

Ce manuscrit a été écrit en respectant la nomenclature de *C. elegans* (Tuli *et al*, 2018).

En minuscule, italique : classe de gènes (ex : *oma*, pour maturation des ovocytes).

En minuscule, italique, suivi d'un numéro : nom du gène (ex : *oma-1*, le premier gène de la classe *oma*).

En lettres romaines, avec une capitale : phénotype (ex : Oma).

En lettres romaines capitales, suivi d'un numéro : protéine (ex : OMA-1, codée par le gène *oma-1*).

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES UTILISÉS

AID	<u>D</u> égon <u>i</u> nductible avec de l' <u>a</u> uxine
AMP	<u>A</u> dénosine <u>m</u> onophosphate
AMPK	<u>K</u> inase activée par l' <u>A</u> MP
ARNi	<u>A</u> RN <u>i</u> ntéférent
CA	<u>C</u> entre d' <u>a</u> ppariement
CED	<u>C</u> ellule de l' <u>e</u> xtrémité <u>d</u> istale
CGDH	<u>C</u> ancer gastrique <u>d</u> iffus <u>h</u> éréditaire
cM	<u>c</u> enti <u>M</u> organ
CS	<u>C</u> ellule <u>s</u> ouche
CSG	<u>C</u> ellule <u>s</u> ouche germinale
CSY	<u>C</u> omplexe <u>s</u> ynaptonémal
DUSP8	<u>P</u> hosphatase à <u>d</u> ouble <u>s</u> pécificité 8
EMS	<u>M</u> éthane <u>s</u> ulfonate d' <u>e</u> thyle
ERK	<u>K</u> inase <u>r</u> égulée par un signal <u>e</u> xtracellulaire
Fem	<u>F</u> éminisé
Fer	<u>F</u> ertile
GHD	Signalisation <u>h</u> oméostatique germinale <u>d</u> éfectueuse
GLH	<u>H</u> élicase de la <u>l</u> ignée germinale
IM	<u>I</u> ndice <u>m</u> itotique
IP ₃	<u>I</u> nositol-(1, 4, 5)- <u>t</u> riphosphate
Let	<u>L</u> étal

LKB1	<u>K</u> inase <u>B</u> 1 du foie
MAP2K	<u>MAPK</u> <u>K</u> inase
MAP3K	<u>MAP2K</u> <u>K</u> inase
MAPK	<u>P</u> rotéine <u>k</u> inase <u>a</u> ctivée par un signal <u>m</u> itogène
MGDS	<u>M</u> écanisme global du <u>d</u> éterminisme <u>s</u> exuel
NAD ⁺	<u>N</u> icotinamide <u>a</u> dénine <u>d</u> inucléotide
NMAT	<u>N</u> icotinique <u>m</u> ononucléotide <u>a</u> dénylyl <u>t</u> ransférase
OMA	<u>M</u> aturation des <u>o</u> vocytes
PDK	<u>K</u> inase <u>d</u> épendante du <u>P</u> IP3
PI3K	<u>P</u> hosphatidy <u>l</u> inositol <u>3</u> - <u>k</u> inase
PIP ₂	<u>P</u> hosphatidy <u>l</u> inositol 4-5-bisphosphate
PIP ₃	<u>P</u> hosphatidy <u>l</u> inositol 3,4,5-triphosphate
PMS	<u>P</u> rotéine <u>m</u> ajeure du <u>s</u> perme
PTEN	<u>P</u> hosphatase et <u>h</u> omologue de la <u>t</u> ensine
RCH	<u>R</u> étro <u>c</u> ontrôle <u>h</u> oméostatique
Rol	<u>R</u> oller
SAM	<u>M</u> otif <u>s</u> térile <u>a</u> lpha
SDC	<u>C</u> ompensation de doses et <u>d</u> éterminisme <u>s</u> exuel
SII	<u>S</u> ignalisation <u>i</u> nsuline/ <u>I</u> GF1R
SNP	<u>P</u> olymorphisme d'un <u>s</u> eul <u>n</u> ucléotide
Ste	<u>S</u> térile
TIR	Protéine de résistance/ <u>r</u> écepteur <u>T</u> oll/ <u>i</u> nterleukine-1

CHAPITRE I

Introduction

1. Les cellules souches

Les cellules souches (CS) jouent un rôle crucial dans la vie d'un organisme. En effet, elles sont à l'origine de toutes les cellules différenciées peuplant les tissus et les organes, permettant d'assurer leur développement, leur fonction et leur homéostasie. Des dysfonctionnements dans la régulation du taux de prolifération des CS peuvent aboutir à des défauts développementaux ou à des pathologies comme le cancer. En effet, des CS avec un taux de prolifération anormalement réduit ne seront pas en mesure de générer un nombre suffisant de cellules requis pour former ou maintenir des tissus et organes fonctionnels. À contrario, un taux de prolifération anormalement élevé est directement associé à de l'hyperplasie et à la formation de tumeurs, en plus de favoriser l'apparition d'erreurs de réplication ou de ségrégation des chromosomes, et par le fait même, l'évolution cancéreuse. En effet, il existe une corrélation entre le nombre de divisions des CS résident dans un tissu donné et le risque de développer un cancer dans ce même tissu. Par exemple, alors que nos cellules souches colorectales se divisent beaucoup plus fréquemment que nos cellules souches osseuses, il y a de plus fortes chances de développer un cancer colorectal plutôt qu'un ostéosarcome (Tomasetti *et al*, 2017; Tomasetti & Vogelstein, 2015).

Les principales caractéristiques des CS sont leur capacité à s'autorenouveler et à engendrer au moins un type cellulaire spécialisé (Watt & Hogan, 2000) (**Figure I-1**). Plusieurs populations de cellules de potentialités intermédiaires peuvent exister entre les CS et les cellules différenciées terminales. Ces progéniteurs transitoires permettent de générer un grand nombre de descendantes, tout en limitant le nombre de divisions de leur CS mère (Watt & Hogan, 2000).

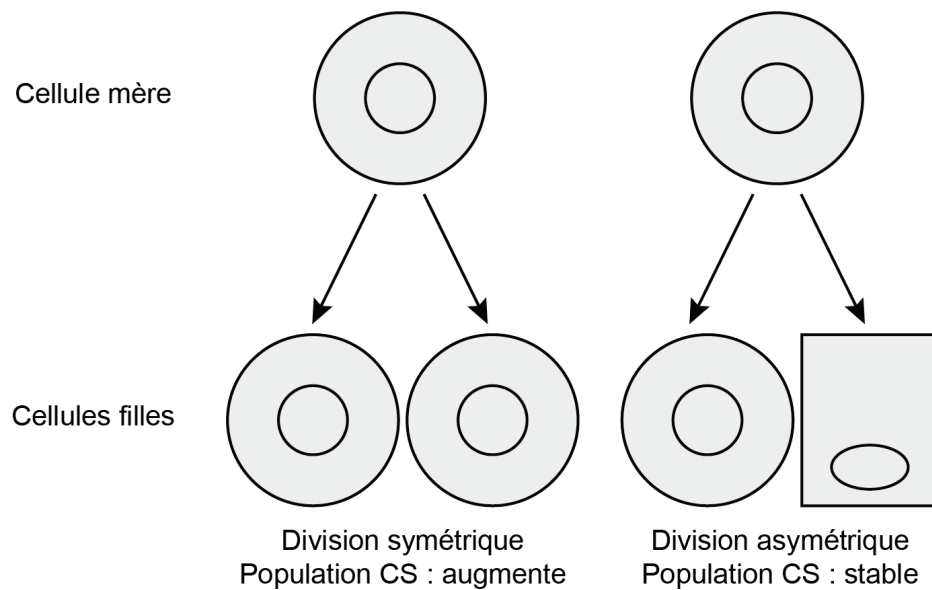


Figure I-1. Les cellules souches peuvent s’auto-renouveler et/ou générer des cellules différenciées. Cercle, cellule immature ; rectangle, cellule engagée dans un processus de différenciation. CS : cellule souche. Adaptée de (Morrison & Kimble, 2006).

La division des CS peut être symétrique, ce qui génère deux cellules filles de potentialités identiques à la cellule mère, ou asymétrique, ce qui génère une cellule fille semblable à la cellule mère et une cellule fille engagée dans un processus de différenciation. Cette asymétrie peut être due à la ségrégation de déterminants moléculaires intrinsèques, qui permettent de maintenir l’identité « souche » de la cellule fille qui en hérite, ou à la position relative des deux cellules filles par rapport à leur micro-environnement extrinsèque. Dans ce cas, bien que la division soit moléculairement symétrique, la destinée des cellules filles est asymétrique (Morrison & Kimble, 2006) (**Figure I-1**).

L’étude de la régulation des CS *in vivo* a été limitée par leur accessibilité, et a nécessité la mise en place d’approches invasives pour les extraire ou les transplanter. La culture des CS *in vitro* a grandement facilité leur accessibilité, l’étude de leur maintenance et leur imagerie. Cependant, les CS sont régulées par un grand nombre de facteurs dans l’organisme, et la caractérisation de ces signaux constitue un domaine de recherche à part entière. Pour répondre à cette problématique,

l'utilisation de modèles animaux invertébrés tels que *D. melanogaster* ou *C. elegans* a émergée (Kimble & White, 1981).

2. *C. elegans* est un organisme modèle permettant d'étudier les CS *in vivo*

2.1. L'utilisation de *C. elegans* a de nombreux avantages

C. elegans est un nématode microscopique qui mesure environ 1 mm à l'âge adulte et vit librement dans le sol, partout à travers le monde, se nourrissant principalement de bactéries. Ces propriétés facilitent sa maintenance en laboratoire, où il est communément cultivé sur des géloses ensemencées de bactéries *E. coli*. Cette espèce existe sous deux formes sexuelles : l'hermaphrodite et le mâle. La majorité des tissus et des organes somatiques sont similaires entre les deux sexes, à savoir leur système digestif, épithélial et excrétoire. Leur système nerveux et musculaire sont semblables, bien qu'il existe des différences au niveau de leurs organes reproducteurs (**voir section 3**). *C. elegans* est protégé par sa cuticule, un exosquelette constitué majoritairement de collagènes et synthétisé par le système épithélial. La cuticule est transparente, ce qui permet de visualiser les organes internes par microscopie à contraste interférentiel différentiel, ou Nomarsky, ainsi que des transcrits ou protéines d'intérêts par hybridation *in situ*, ou immunomarquage, respectivement (Wormatlas).

C. elegans est un modèle génétique intéressant en raison de son nombre réduit de chromosomes (5 paires d'autosomes, 1 paire de chromosomes sexuels) et la capacité des hermaphrodites à s'autoféconder. Cette propriété facilite la maintenance des souches, en plus de simplifier les croisements génétiques. De nombreux outils de biologie moléculaire ont été adaptés pour *C. elegans*, comme l'injection de transgènes ou l'édition du génome en utilisant les « ciseaux moléculaires », CRISPR-Cas9 – une technologie récente qui valut le prix Nobel de chimie aux

docteurs Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier, en 2020. Enfin, un *C. elegans* hermaphrodite engendre un grand nombre de descendants (environ 300 à 15°C) et son cycle de vie est très court (environ 3 jours à 15°C) (Wormatlas), ce qui facilite les criblages de gènes ou de molécules pharmaceutiques.

2.2. Le cycle de vie de *C. elegans*

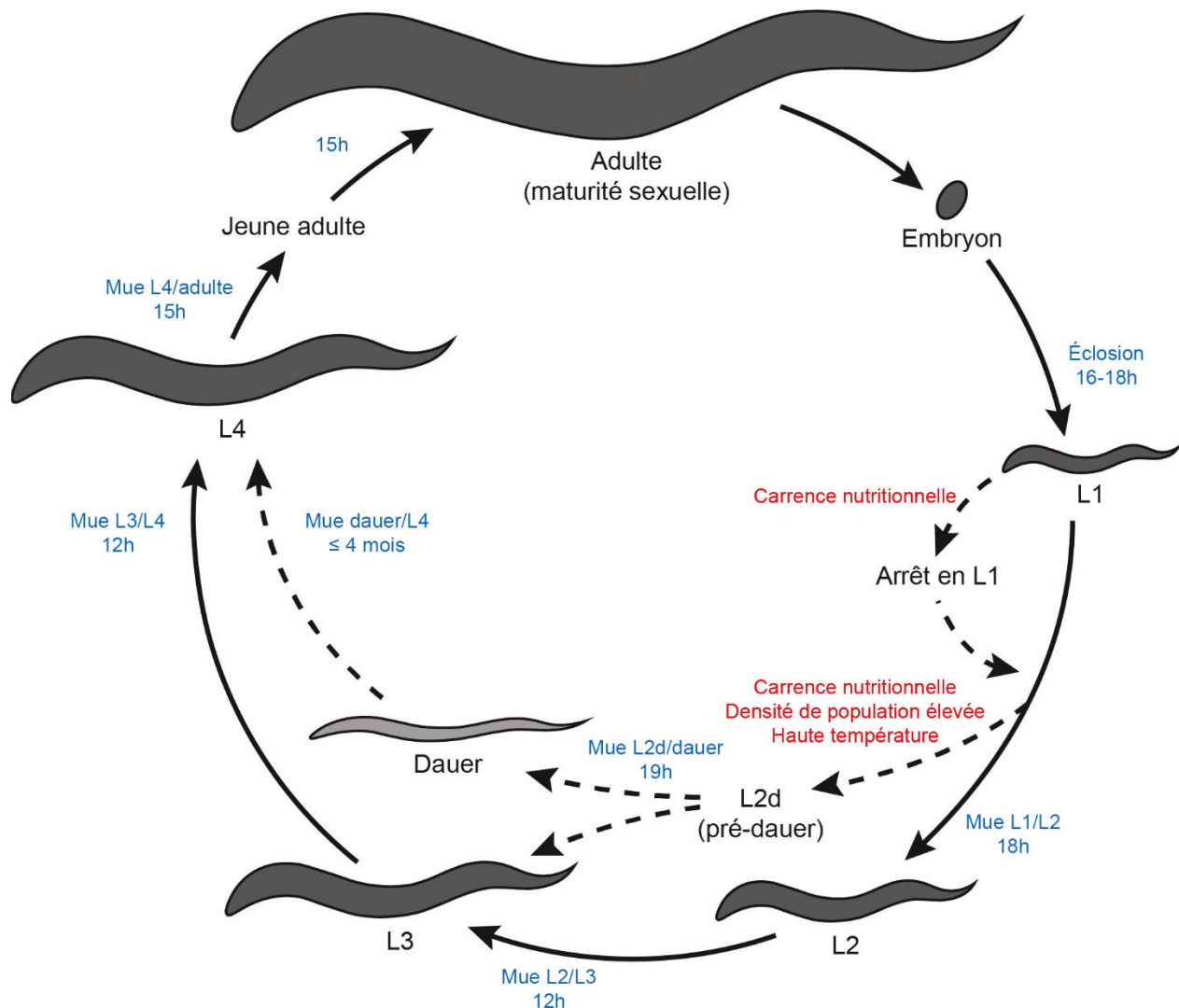


Figure 12. Cycle de vie du *C. elegans* hermaphrodite. Texte noir, stades de développement ; bleu, événements développementaux et temps écoulé depuis le stade précédent à 15°C ; rouge, conditions environnementales défavorables. Pointillés : choix alternatifs. Antérieur, à gauche ; dorsal, en haut. Le rapport proportionnel entre la longueur des individus aux différents stades est respecté. Adaptée de Wormatlas.

Le cycle de vie de *C. elegans* comprend son développement embryonnaire, un développement juvénile de quatre stades larvaires successifs – L1 à L4 – et l'âge adulte. Chaque stade larvaire est ponctué par une mue, au cours de laquelle une nouvelle cuticule est synthétisée par le système épithélial. Dans des conditions environnementales défavorables, le développement des larves peut être temporairement interrompu pour favoriser l'entrée dans des stades de résistance réversibles, tels que l'arrêt au stade L1 ou l'engagement vers le stade L2d, qui conduit à une diapause alternative au stade L3, appelée « dauer ». Cette forme très résistante s'accompagne d'adaptations comportementales permettant la survie et la propagation vers un nouveau milieu plus favorable (Wormatlas) (**Figure I-2**).

2.3. *C. elegans* est utilisé comme modèle dans de nombreux domaines en recherche.

L'utilisation de *C. elegans* permet d'investiguer un grand nombre de processus biologiques, à l'échelle moléculaire, cellulaire et de l'organisme. Entre autres, plusieurs études ont mené à des découvertes majeures récompensées par des prix Nobel. En effet, le prix en physiologie ou médecine a été attribué aux docteurs Sydney Brenner, Bob Horvitz et John Sulston, en 2002, pour leurs découvertes concernant la régulation génique du développement et de la mort cellulaire programmée ; aux docteurs Craig Mello et Andrew Fire, en 2006, pour leur découverte de l'interférence à l'ARN ; et aux docteurs Victor Ambros et Gary Ruvkun, en 2024, pour leur découverte des microARNs et leurs rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique. Un tiers du prix Nobel de chimie a également été remis au docteur Martin Chalfie pour la découverte et le développement de la protéine fluorescente verte, GFP.

En outre, les travaux des docteur-e-s Sydney Brenner, Bob Horvitz, John Sulston, Einhard Schierenberg, John White, Nichol Thomson, Judith Kimble et David Hirsh ont mis en évidence que le développement de *C. elegans* est stéréotypé, ce qui a permis d'établir le lignage cellulaire

des 959 cellules somatiques (1033 dans les mâles) et du millier de cellules germinales présentes dans les gonades adultes (Wormatlas). Le développement de la vulve des hermaphrodites est un modèle historique, et nécessite entre autres des inhibitions latérales, l'établissement d'un gradient induisant différentes identités cellulaires, l'envahissement d'une cellule et des mouvements morphogénétiques (Sternberg, 2005). De nombreux laboratoires utilisent encore *C. elegans* dans des domaines variés de la recherche tels que le vieillissement, la neurobiologie ou l'immunologie.

Malgré un lignage somatique stéréotypé, la lignée germinale de *C. elegans* comprend des CS (Kimble & Hirsh, 1979). Comme nous l'avons vu, l'utilisation de *C. elegans* a de nombreux avantages, qui en font un modèle privilégié pour étudier la régulation des CS *in vivo*.

3. Dimorphisme et déterminisme sexuel de *C. elegans*

3.1. Le dimorphisme sexuel

Les deux formes sexuelles de *C. elegans* diffèrent par leur anatomie, leur physiologie et leur comportement. Le dimorphisme sexuel de *C. elegans* est très prononcé, car environ 40% des cellules somatiques masculines et 30% des cellules somatiques hermaphrodites constituent l'appareil reproducteur (Sulston & Horvitz, 1977). Les hermaphrodites – de caryotype XX – ont un appareil reproducteur similaire aux femelles d'autres espèces animales. Il est constitué de (i) la lignée germinale, (ii) la gonade somatique – les cellules de l'extrémité distale, les cellules de la gaine gonadique (5 paires par gonades) et la spermathèque – et (iii) l'appareil de ponte – l'utérus et la vulve – (**Figure I-3A-B**). Les mâles – de caryotype XO – ont un appareil reproducteur constitué de (i) la lignée germinale, (ii) la gonade somatique – les cellules de l'extrémité distale, la vésicule séminale et le canal déférent –, (iii) du proctodeum, un organe également impliqué dans

le système digestif et (iv) de l'éventail, constitué de cellules sensorielles (Wormatlas) (**Figure I-3C-D**).

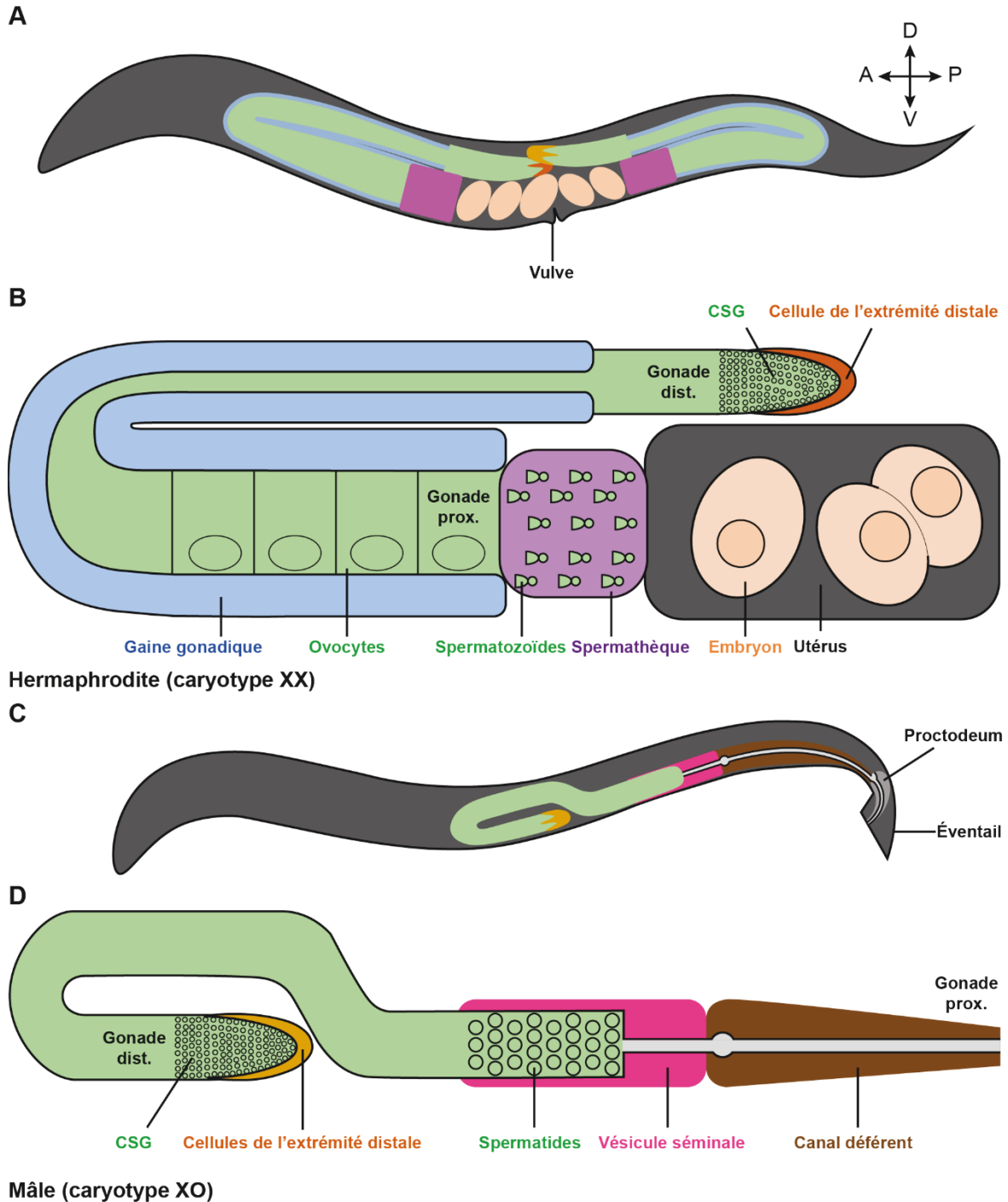


Figure I-3. Dimorphisme sexuel de *C. elegans*. (A) Schématisation d'un hermaphrodite adulte (caryotype XX). A, antérieur ; P, postérieur ; D, dorsal ; V, ventral (l'orientation est la même dans toute la figure). (B) Schématisation de la gonade antérieure d'un hermaphrodite adulte. Vert, lignée germinale ; autres couleurs : gonade somatique. CSG, cellules souches germinales. Dist, distal ; prox, proximal. (C) Schématisation d'un mâle adulte (caryotype XO). (D) Schématisation de la gonade d'un mâle adulte. Code couleur et annotation semblables à (B). (A-C) les structures indiquées font partie de l'appareil reproducteur, mais n'appartiennent ni à la lignée germinale, ni à la gonade somatique. Adaptée de Wormatlas,

Les hermaphrodites sont capables de produire des spermatozoïdes pour s'autoféconder, et de se s'accoupler avec des mâles. La progéniture des hermaphrodites qui s'autofécondent est par conséquent majoritairement XX (hermaphrodite), bien que dans approximativement 0,2% des cas, un défaut de ségrégation des chromosomes aboutit à la formation d'un gamète dépourvu de chromosome X, et à l'apparition d'un mâle lors de la fécondation par un gamète X (Hodgkin, 1983a; Hodgkin *et al*, 1979). L'augmentation du nombre de défauts de ségrégation des chromosomes X aboutit à une plus forte incidence de mâles dans la population. Ce phénomène peut se produire en réponse à un stress, comme un choc thermique, ce qui permet de faciliter les brassages interchromosomiques dans la population et permettre de trouver une stratégie adaptative. Détourner ce mécanisme au laboratoire facilite la génération de mâles nécessaires à l'exécution de croisements génétiques entre les différentes souches d'intérêt (Hodgkin, 1983a).

3.2. Le mécanisme global du déterminisme sexuel de *C. elegans*

Chez *C. elegans*, le déterminisme sexuel est contrôlé par un mécanisme global (MGDS). Le MGDS est intimement lié à la compensation de doses d'expression des gènes liés au chromosome X, et a été appuyé par de nombreux tests épistatiques (Hodgkin, 1987; Villeneuve & Meyer, 1990). Bien que le MGDS soit requis dans les deux sexes, des régulateurs additionnels existent chez l'hermaphrodite pour permettre de masculiniser temporairement la lignée germinale, et ainsi initier la phase de spermatogenèse transitoire du stade L4.

Le MGDS débute par l'intégration du nombre de chromosomes X par rapport au nombre d'autosomes (ratio X/A). En effet, l'expression de gènes féminisants par le chromosome X – inhibiteurs de l'activité de XOL-1 – est contrebalancée par l'expression de gènes masculinisants par les autosomes – activateurs de XOL-1 – (Miller *et al*, 1988; Rhind *et al*, 1995). En aval de

XOL-1, une cascade d'inhibitions aboutit au contrôle de l'activité du régulateur terminal TRA-1 (Figure I-4).

3.2.1. Compensation de doses et déterminisme sexuel

Différentes stratégies de compensation de doses ont été sélectionnées par l'évolution. Chez la drosophile, les gènes liés au chromosome X sont exprimés deux fois plus dans le mâle (caryotype XY) par rapport aux femelles (caryotype XX). Chez les mammifères, un des deux chromosomes X féminins (caryotype XX), déterminé aléatoirement, est complètement mis sous silence. Chez *C. elegans*, XOL-1 inhibe les trois protéines compensation de doses et déterminisme sexuel (SDC). Étant donné que l'expression de XOL-1 est réprimée dans les hermaphrodites (caryotype XX), les protéines SDC forment un complexe multiprotéique qui se lie aux deux chromosomes X pour réduire de moitié la transcription de leurs gènes (Meyer, 2000). Ce complexe régule aussi le déterminisme sexuel en se liant au promoteur de *her-1*, ce qui aboutit à la répression de son expression à hauteur de 5% de son expression dans les mâles (Chu *et al*, 2002; Dawes *et al*, 1999; Trent *et al*, 1991). Les protéines SDC fonctionnent donc à la fois dans la compensation de doses et dans le déterminisme sexuel. Le mécanisme en aval des protéines SDC est spécifique au déterminisme sexuel (Figure I-4).

3.2.2. HER-1 contrôle le déterminisme sexuel de manière cellulaire non-autonome en levant l'inhibition des protéines FEM

HER-1 est une protéine sécrétée qui favorise la destinée masculine de manière cellulaire non-autonome, en inhibant la fonction de la protéine transmembranaire TRA-2 (Hunter & Wood, 1990; Perry *et al*, 1993). TRA-2 ne peut alors inhiber trois protéines masculinisantes, dont la perte de fonction individuelle abouti à un phénotype féminisé (FEM). En effet, les protéines FEM sont

requis dans le déterminisme masculin et des tests d'épistasie ont placé leur fonction entre le récepteur TRA-2 et le facteur de transcription TRA-1 (Hodgkin, 1986). L'inhibition des protéines FEM par TRA-2 dans les hermaphrodites est supprimée par la fonction de HER-1 dans les mâles. Cette régulation se déroule au niveau post-transcriptionnel ou post-traductionnel, étant donné que le niveau des transcrits *fem* est semblable entre les deux sexes (Ahringer *et al*, 1992; Gaudet *et al*, 1996; Pilgrim *et al*, 1995). Les interactions physiques de TRA-2 avec FEM-3 d'une part, et de FEM-3 avec FEM-2 d'autre part, ont été mises en évidence *in vitro* (Chin-Sang & Spence, 1996; Mehra *et al*, 1999). HER-1 s'associerait avec la région extracellulaire du récepteur TRA-2, ce qui aboutirait à un changement de conformation empêchant la région intracellulaire de s'associer à FEM-2 et FEM-3 (**Figure I-4**).

3.2.3. Le régulateur terminal TRA-1 détermine l'identité sexuelle dans les cellules somatiques

Le mécanisme global de déterminisme sexuel requiert l'activité du facteur de transcription identitaire *tra-1*, qui contrôle un programme d'expression génique féminisant (Hodgkin, 1983b, 1987). Il a été proposé que les protéines FEM inhibent TRA-1 en agissant sur sa localisation subcellulaire, ses modifications post-traductionnelles et/ou sa dégradation (Segal *et al*, 2001) (**Figure I-4**).

3.3. Le mécanisme germinale du déterminisme sexuel

3.3.1. Le déterminisme sexuel dans la lignée germinale requiert les protéines FEM et FOG

Dans les cellules germinales, le déterminisme sexuel masculin requiert l'activité de gènes masculinisants – dont la perte de fonction aboutit à la féminisation de la lignée germinale – *fog-1*, *fog-3*, *fem-1*, *fem-2* et *fem-3* (Barton & Kimble, 1990; Doniach & Hodgkin, 1984; Ellis & Kimble, 1995; Hodgkin, 1986). Des analyses épistatiques ont montré que *fog-1* et *fog-3* agissent en aval du

mécanisme global, et qu'ils sont donc des régulateurs terminaux du déterminisme sexuel spécifiques à la lignée germinale. FOG-1 et FOG-3 appartiennent à deux familles de protéines se liant aux ARNm, ce qui permet de réguler l'expression de gènes cibles de manière post-transcriptionnelle (Chen *et al.*, 2000b; Mendez & Richter, 2001). Cependant, leurs cibles n'ont pas encore été identifiées.

TRA-1 contrôle le déterminisme sexuel dans la lignée germinale en régulant la transcription de *fog-1* et de *fog-3* (Chen *et al.*, 2000b; Jin *et al.*, 2001). En effet, les promoteurs de ces deux gènes présentent plusieurs sites de liaison de TRA-1 (Chen *et al.*, 2000b; Jin *et al.*, 2001). De plus, le promoteur de *fog-3* est retardé sur gel en présence de TRA-1, et cette liaison requiert des sites de liaison intacts dans le promoteur de *fog-3* (Chen *et al.*, 2000b). Cependant, certains de ces sites permettent l'activation de la transcription d'un transgène *fog-3*, alors qu'au moins un site serait requis dans la répression du transgène. TRA-1 active ou réprime donc l'expression de *fog-3* en se fixant à son promoteur, dépendamment du contexte.

De la même manière que dans le soma, les gènes *fem* régulent l'activité de *tra-1* dans les cellules germinales. Des expériences de RT-qPCR dans les doubles mutants *fem-3*; *tra-1* montrent que les protéines FEM agissent par le biais de TRA-1 pour contrôler les niveaux de transcrits *fog-3* (Chen *et al.*, 2000b). Cependant, les doubles mutants produisent des ovocytes plutôt que des spermatozoïdes – et phénotypent donc les simples mutants *fem-3* – ce qui indique que les protéines FEM agissent également en aval de TRA-1. Il a été spéculé que les protéines FEM activent directement FOG-1 et FOG-3, ou encore qu'elles régulent une autre cible masculinisante (**Figure I-4**).

3.3.2. Des modules de régulation permettent de favoriser la spermatogenèse de manière transitoire dans les hermaphrodites

Les hermaphrodites sont capables d'initier une phase transitoire de spermatogenèse au stade L4, bien qu'ils n'expriment pas HER-1, le signal masculinisant agissant de manière cellulaire non-autonome dans les mâles. Des criblages génétiques ont mis en évidence deux branches permettant de masculiniser temporairement la lignée germinale des hermaphrodites.

3.3.2A – La traduction de l'ARNm *tra-2* est temporairement inhibée par GLD-1 et FOG-2 durant la spermatogenèse

Des mutations gain-de-fonction de *tra-2* dans les hermaphrodites aboutissent à un phénotype féminisé (Doniach, 1986). Ces mutations gain-de-fonction affectent des éléments « TRA-2 et GLI1 » (TGE) dans la région 3' non-traduite (3' UTR) du transcrit *tra-2* (Goodwin *et al.*, 1993). Dans les vers sauvages, les TGE permettent la liaison d'un complexe protéique incluant GLD-1 (Goodwin *et al.*, 1993; Jan *et al.*, 1999). De plus, la GLD-1 somatique peut réprimer des transgènes incluant des TGE (Jan *et al.*, 1999), tandis que des expériences d'immunomarquage ont mis en évidence que le niveau d'expression de TRA-2 est augmentés dans la lignée germinale des mutants *gld-1(ø)* (Jan *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que GLD-1 est requis pour inhiber de TRA-2 au niveau post-transcriptionnel. Une expérience de criblage double-hybride a permis de mettre en évidence que GLD-1 peut interagir physiquement avec FOG-2, une protéine spécifiquement requise pour la spermatogenèse des hermaphrodites (Schedl & Kimble, 1988). Un test d'épistasie a montré que FOG-2 agit en amont de TRA-2, et la perte de fonction de FOG-2 aboutit au même phénotype féminisé que le gain de fonction de TRA-2 (Schedl & Kimble, 1988). Il a donc été proposé que durant la spermatogenèse des hermaphrodites, GLD-1 et FOG-2 répriment la traduction de l'ARNm *tra-2* en se fixant dans sa région 3'UTR et en y-recrutant d'autres cofacteurs (**Figure I-4**).

3.3.2B – La régulation dynamique de la traduction du transcrit *fem-3* permet d’assurer la spermatogenèse ou d’effectuer la transition vers l’ovogenèse

Les hermaphrodites deviennent fertiles uniquement à partir de la transition de la spermatogenèse vers l’ovogenèse. Plusieurs éléments semblent indiquer que la durée de la période de spermatogenèse est déterminée par le ratio de l’activité de TRA-2 par rapport à FEM-3. En effet, un gain de fonction de *tra-2*, comme nous l’avons vu, féminise les hermaphrodites. En d’autres termes, ces mutants produisent constitutivement des ovocytes, jusqu’à ce que leur accumulation devienne critique et active la signalisation homéostatique (Cinquin *et al.*, 2016; Doniach, 1986; Narbonne *et al.*, 2015, 2017) (**voir section 7**). Réciproquement, un gain de fonction de *fem-3* aboutit à une production constitutive de spermatozoïdes à la place des ovocytes dans les hermaphrodites (Barton *et al.*, 1987). Enfin, les deux mutations gain de fonction de *tra-2* et *fem-3* se neutralisent, si bien que les doubles mutants forment à la fois des spermatozoïdes et des ovocytes (Schedl & Kimble, 1988). Étant donné que le déterminisme sexuel des cellules germinales est influencé par le ratio des activités de TRA-2 et de FEM-3, des modules permettent de réprimer l’expression de FEM-3 à la fin de la spermatogenèse pour assurer la transition vers l’ovogenèse (**Figure I-4**).

3.3.2C – L’inhibition de la traduction de *fem-3* par les FBF, NOS-3 et les MOG permet de favoriser l’ovogenèse

Les hermaphrodites ne peuvent pas basculer de la spermatogenèse vers l’ovogenèse sans que l’activité de *fem-3* ne soit réprimée grâce à un élément mutation ponctuelle (PME) de 5 nucléotides, situé dans sa région 3’ UTR (Ahringer & Kimble, 1991; Ahringer *et al.*, 1992; Rosenquist & Kimble, 1988). Les mutations qui affectent le PME aboutissent à un gain-de-fonction de *fem-3* et à une spermatogenèse constitutive. En utilisant une approche de criblage triple-hybride,

il a été montré que les protéines FBF (FBF-1 et FBF-2) se lient au transcrit *fem-3* dans sa région 3'UTR, au niveau du PME (Zhang *et al*, 1997). Les mutations gain de fonction de *fem-3* empêchent la fixation des FBF. De plus, la réduction de fonction des gènes *fbf* par ARNi phénocopie les mutants gain de fonction de *fem-3*. Les FBF répriment donc l'expression du gène masculinisant *fem-3* en se fixant à sa région 3' UTR.

Les protéines FBF sont des homologues du régulateur post-transcriptionnel Pumilio de la drosophile, qui interagit avec Nanos pour inhiber la traduction du transcrit *hunchback*. De la même manière, un crible double-hybride utilisant des banques de protéines de *C. elegans* a montré que les FBF interagissent physiquement avec NOS-3, et la réduction de NOS-3 (et des deux autres homologues de Nanos, NOS-1 et NOS-2) par ARNi dans les hermaphrodites aboutit à une spermatogenèse constitutive (Kraemer *et al*, 1999). Ces données suggèrent que les FBF interagissent avec les NOS pour réprimer la traduction du transcrit *fem-3*.

Le même crible double-hybride a mis en évidence l'interaction physique de GLD-3 avec FBF-1 et FBF-2 (Eckmann *et al*, 2002). GLD-3 est un homologue de Bicaudal-C (de la drosophile) qui joue plusieurs rôles dans le développement de la lignée germinale. GLD-3 favorise notamment l'entrée en méiose (**voir section 6**) et la spermatogenèse. Dans les hermaphrodites et mâles *gld-3(ø)*, certaines cellules qui auraient dû être spécifiées en spermatozoïdes deviennent des ovocytes à la place. Le phénotype de la perte de fonction de *gld-3* est supprimé par la perte de fonction des FBF, ce qui indique que GLD-3 régule négativement les FBF au cours de la période de spermatogenèse (Eckmann *et al.*, 2002).

La régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm *fem-3* est sous contrôle d'un second groupe de gènes. La perte de fonction d'un gène parmi *mog-1* à *-6* est suffisante pour induire une spermatogenèse constitutive dans les hermaphrodites (Graham & Kimble, 1993; Graham *et al*, 1993). Une expérience intéressante a été menée en utilisant un gène rapporteur transgénique codant

pour une protéine fluorescente en amont de la région 3' UTR de *fem-3*. Le rapporteur n'est pas détectable dans les tissus somatiques, ce qui implique que son expression a été réprimée. La mutation de la région 3' UTR ou la perte de fonction d'un gène *mog* est suffisante pour lever l'inhibition de l'expression du transgène. Cette étude suggère que les MOG inhibent l'expression du transcrit *fem-3* en se fixant à sa région 3' UTR, de la même manière que les FBF et NOS-3 (Gallegos *et al*, 1998) (**Figure I-4**).

Mécanisme global (somatique)

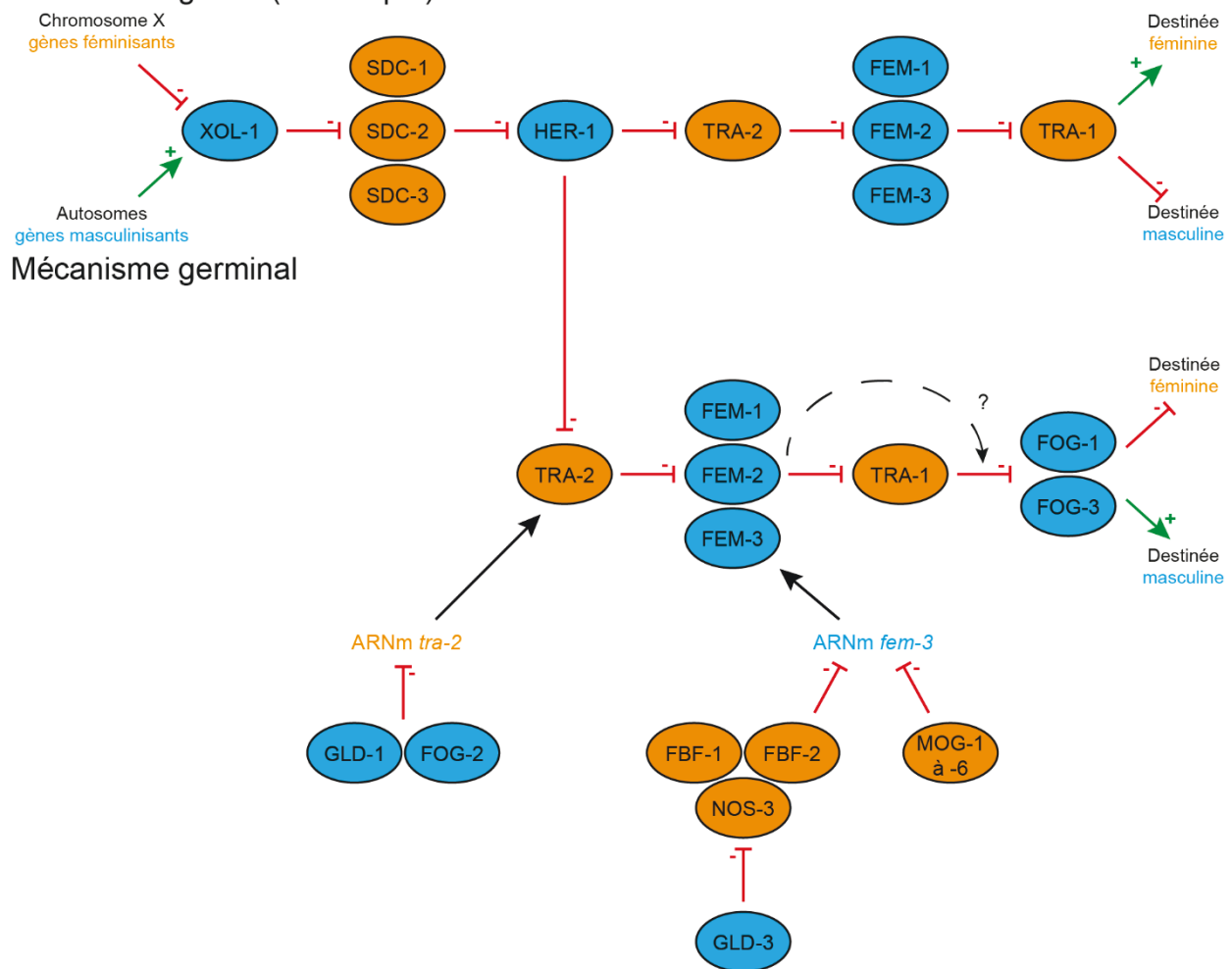


Figure I-4. Réseau de régulation contrôlant le déterminisme sexuel dans la lignée somatique et germinale. Flèches vertes, stimulation ; barres rouges, inhibition. Orange, gènes féminisants ; bleu, gènes masculinisants. Pointillés, des données expérimentales contradictoires placent les protéines FEM en amont et en aval de TRA-1 dans la lignée germinale. Adaptée de (Ellis & Schedl, 2007; Zarkower, 2006). Adaptée de (Ellis & Schedl, 2007; Zarkower, 2006).

En l'absence de spermatozoïdes, les hermaphrodites adultes ont des mécanismes de régulation qui permettent d'éviter le gaspillage des ovocytes, dont la production est coûteuse en

énergie. Ces mécanismes permettent d'inhiber la prolifération des CS germinales (CSG), dépendamment du besoin en cellules différenciées, et peuvent être déclenchés en utilisant des mutations féminisantes (Cinquin *et al.*, 2016; Narbonne *et al.*, 2015, 2017). La gonade des *C. elegans* hermaphrodites adultes est donc un modèle intéressant pour caractériser ces signaux inhibiteurs de la prolifération des CS (**voir section 7**).

4. Développement des gonades et organisation de la méiose chez les *C. elegans* hermaphrodites

4.1. Développement des gonades au cours des stades larvaires et gamétogenèse

Lors du stade L1, le primordium des gonades est situé dans la région ventrale, au milieu de l'axe antéro-postérieur. Il est constitué de quatre cellules fondatrices, deux germinales et deux somatiques. Les progéniteurs de la lignée germinale, Z2 et Z3, qui sont issues de la cytokinèse incomplète de la cellule primordiale P4 (Bauer *et al.*, 2021), sont bordés des progéniteurs de la gonade somatique, Z1 et Z4 (**Figure I-5**). Les CSG primordiales sont quiescentes au cours du développement embryonnaire, et ne prolifèrent qu'après l'éclosion dans un milieu favorable, riche en nutriments (Sulston *et al.*, 1983).

À la fin du stade L1, Z1 et Z4 prolifèrent pour générer 12 cellules. Deux d'entre elles sont les cellules de l'extrémité distale, nécessaires au maintien et à la prolifération des CSG, en inhibant leur entrée en méiose. La cellule de l'extrémité distale (CED) crée une polarisation distale-proximale de la lignée germinale, les cellules distales étant mitotiques et les proximales méiotiques. Les dix autres cellules somatiques sont des précurseurs situés dans la région proximale, qui se réorganisent au cours du stade L2 pour former le primordium des gonades somatiques (**Figure I-5**). Au cours des stades L1 et L2, les CSG sont réparties en deux populations, antérieure et

postérieure, et prolifèrent de manière exponentielle. L'absence de synchronicité des divisions cellulaires dans la lignée germinale peut-être expliquée par la cellularisation partielle des noyaux et du cytoplasme qui les entoure (Hirsh *et al*, 1976) (**Figure I-5**).

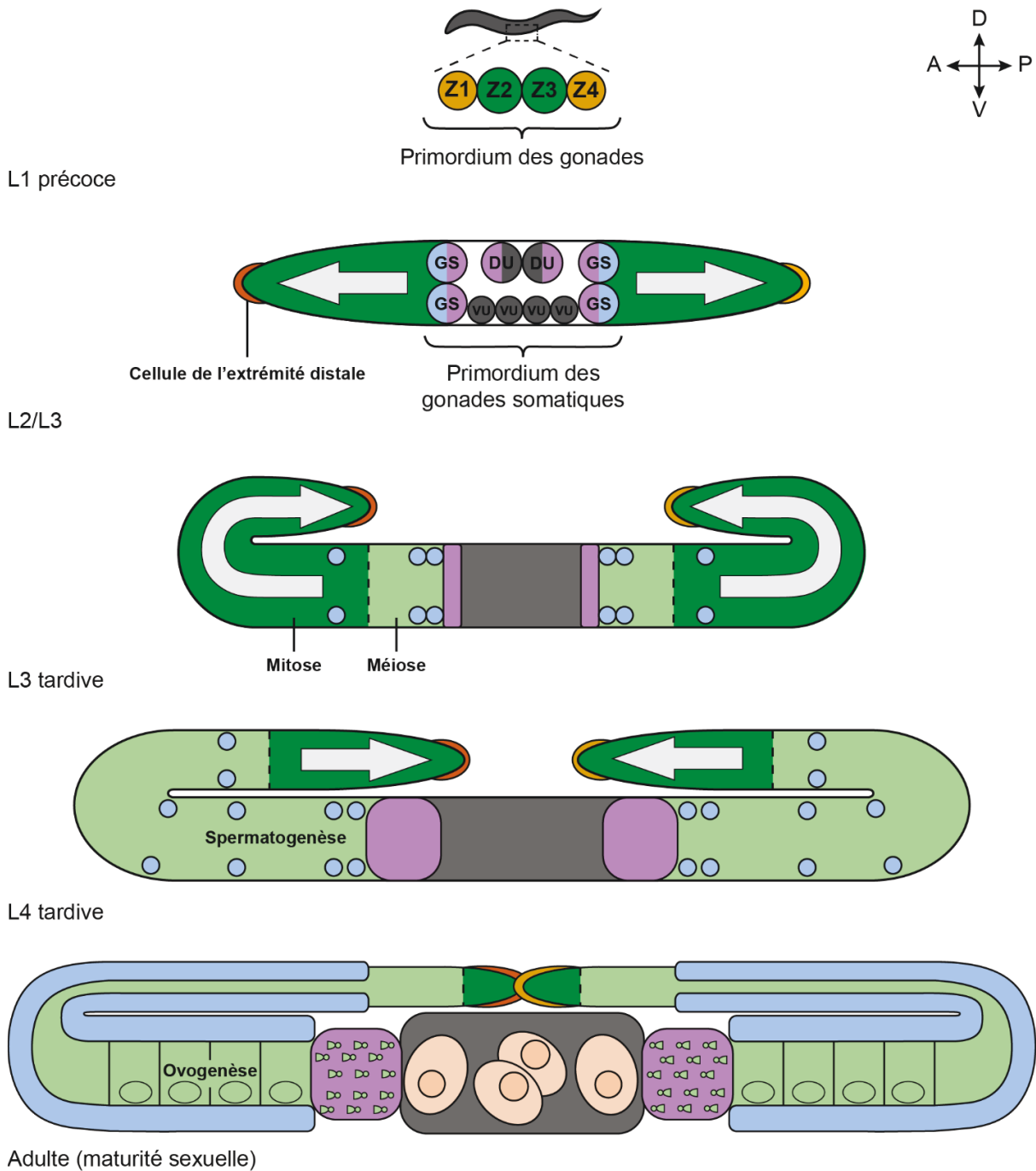


Figure I-5. Développement des gonades hermaphrodites. A, antérieur ; P, postérieur ; D, dorsal ; V, ventral. L1-L4 ; stade larvaire L1 à L4 (l'orientation est la même dans toute la figure). Code couleur des organes similaire à la figure I-3B. Flèches blanches, les trois phases d'élargissement des gonades. Pointillés, délimitation entre les compartiments mitotique (vert foncé) et méiotique (vert clair). GS, progéniteur gaine/spermathèque ; DU, progéniteur spermathèque/utérus dorsal ; VU, progéniteur utérus ventral ; Z1-Z4, cellules primordiales germinales Z2-Z3 et somatiques Z1-Z4. Adaptée de (Hubbard & Greenstein, 2005).

Durant le stade L3, les dix précurseurs constituant le primordium somatique génèrent les cellules qui deviendront la gaine gonadique, la spermathèque et l'utérus (Wormatlas) (**Figure I-5**). Les CSG prolifèrent rapidement sous l'influence de signaux provenant de la CED et de la gaine en développement (Killian & Hubbard, 2005; McCarter *et al*, 1997). Les deux gonades s'allongent dans un premier temps dans des directions opposées, selon l'axe antéropostérieur, avant de bifurquer vers la région dorsale, et d'initier un mouvement de migration convergent aboutissant à la forme en U caractéristique des gonades. Les CSG les plus proximales, qui ne reçoivent plus le signal inhibiteur de la différenciation provenant de la CED, entrent en prophase I de méiose. Une phase de spermatogenèse transitoire est ainsi initiée, qui se poursuit au cours du stade L4, générant un nombre limité de spermatozoïdes, stockés dans les spermathèques. Chez l'adulte, la lignée germinale change de programme de différenciation de manière irréversible, et bascule vers l'ovogenèse (Zanetti & Puoti, 2013) (**Figure I-5**) (**voir section 3**). La génération de nouveaux ovocytes se perpétue par la suite, mais leur rythme de production dépend du stock de spermatozoïdes.

La progression en prophase I des cellules germinales engagées en méiose se déroule selon la polarité établie par la CED.

4.2. Organisation spatiale de la prophase I méiotique dans la gonade hermaphrodite adulte

4.2.1. Zone de transition, stades leptotène et zygotène : appariement et formation des axes des chromosomes

Durant les stades leptotène et zygotène de la prophase I de méiose, qui prennent place dans la zone de transition (**Figure I-6**), les chromosomes homologues s'apparient (ce processus est également nommé formation de synapses). Chez *C. elegans*, des séquences *cis* à proximité de l'extrémité de chaque chromosome permettent l'assemblage de complexes nucléoprotéiques, les

centres d'appariement, qui attachent les chromosomes à l'enveloppe nucléaire (Herman & Kari, 1989; McKim *et al*, 1988; Rose *et al*, 1984; Rosenbluth & Baillie, 1981; Villeneuve, 1994). Les CA ont une composition chromosome-spécifique, permettant la liaison de protéines telles que HIM-8, ZIM-1, ZIM-2 ou ZIM-3 (Phillips & Dernburg, 2006; Phillips *et al*, 2005). Cela permet la reconnaissance, l'alignement et la formation de synapses entre les homologues – qui disposent de centres d'appariement similaires (Harper *et al*, 2011; Labella *et al*, 2011; Phillips & Dernburg, 2006; Phillips *et al*, 2009; Phillips *et al.*, 2005). Le mouvement des centres d'appariement, qui favorise l'appariement des homologues, nécessite les microtubules et la dynéine (Sato *et al*, 2009; Wynne *et al*, 2012). La formation de synapses coïncide avec un remodelage de la chromatine : les chromosomes sont repoussés d'un côté du noyau, à l'opposé du nucléole. La chromatine adopte alors une forme de croissant de lune, caractéristique de la zone de transition (MacQueen & Villeneuve, 2001). Les chromosomes homologues sont tous appariés à la sortie de la zone de transition (MacQueen & Villeneuve, 2001).

Durant la phase S de méiose, des cohésines sont chargées sur les chromosomes méiotiques. Ces complexes en forme d'anneaux sont constitués d'un dimère de protéines SMC, et d'une kleisine qui permet de fermer la boucle (Gligoris & Lowe, 2016). Il existe trois cohésines spécifiques à la méiose chez *C. elegans*, qui diffèrent par leur sous-unité kleisine, REC-8, COH-3 ou COH-4 (Pasierbek *et al*, 2001; Severson *et al*, 2009; Severson & Meyer, 2014). Ces protéines sont nécessaires pour la cohésion des chromatides sœurs, mais aussi pour la complétion des sous-étapes de la prophase I. Dans la zone de transition, les cohésines s'associent avec les protéines des axes des chromosomes, qui s'intercalent entre les deux chromatides sœurs (Hayashi *et al*, 2007; Nabeshima *et al*, 2011; Pasierbek *et al.*, 2001; Severson & Meyer, 2014). L'assemblage des axes est strictement dépendant de la présence de cohésines. En effet, la perte de SMC-1 ou SCC-3 (deux composantes de la famille SMC dans toutes les cohésines), des trois kleisines ou du facteur de

chargement des cohésines, SCC-2, empêchent la liaison des protéines HORMA au niveau de l'axe, et aboutissent à des défauts sévères comme l'incapacité de former des chiasmes entre les homologues lors de l'enjambement (ou crossing-over) (Hayashi *et al.*, 2007; Nabeshima *et al.*, 2011; Pasierbek *et al.*, 2003; Severson & Meyer, 2014).

Les protéines à domaine HORMA jouent un rôle crucial dans l'établissement de la structure des chromosomes méiotiques. Quatre protéines HORMA sont codées par le génome de *C. elegans*, HIM-3, HTP-1, HTP-2 et HTP-3. HIM-3, HTP-1 et -2 sont principalement constituées d'un domaine HORMA, flanqué de courtes régions N- et C-terminales. HTP-3 contient quatre sites de liaison pour HIM-3, HTP-1 et -2 (Kim *et al.*, 2014) et joue donc un rôle central dans l'assemblage des axes. HTP-3 favorise la génération de cassures double-brin (Goodyer *et al.*, 2008) et l'acquisition de modifications post-traductionnelles dans la chromatine associée aux axes (Couteau & Zetka, 2011). HIM-3 et HTP-1, quant à elles, jouent un rôle dans l'assemblage du complexe synaptonémal (CSY). Ainsi, les simples mutants *him-3* et *htp-1* ont des défauts de formation d'enjambements.

4.2.2. En amont du coude, stade pachytène : assemblage du complexe synaptonémal et enjambement.

À la sortie de la zone de transition (**Figure I-6**), les protéines de l'axe sont appariées à un complexe spécifique à la méiose, le CSY. Des observations par microscopie électronique ont décrit la structure du CSY, semblable à une échelle, constitué d'une région centrale qui contient des filaments transversaux faisant le pont entre les axes de deux homologues (Colaiacono, 2006; MacQueen *et al.*, 2002). Quatre composants du CSY ont été identifiées chez *C. elegans* : SYP-1, SYP-2, SYP-3 et SYP-4. Ces protéines sont interdépendantes pour leur chargement sur les chromosomes, si bien que l'assemblage du CSY ne peut avoir lieu dans les simples mutants

(Colaiacono *et al*, 2003; MacQueen *et al*, 2002; Smolikov *et al*, 2007b). De la même manière, la perte d'HTP-3 ou des trois kleisines (REC-8, COH-3 et COH-4) aboutit à un défaut d'assemblage du CSY. Une fois assemblé, le CSY stabilise l'appariement des chromosomes homologues, et favorise l'apparition d'enjambements.

La ségrégation des chromosomes durant la méiose requiert la formation d'enjambements. Ces derniers sont nécessaires, avec la cohésion des chromatides-sœurs, pour stabiliser l'appariement des chromosomes et favoriser leur alignement au fuseau mitotique en métaphase I. La première étape de l'apparition d'un enjambement est la génération d'une cassure double-brin par l'enzyme SPO-11 (Dernburg *et al*, 1998). La réparation des cassures double-brin ressemble à la recombinaison homologue des cellules mitotiques, avec des adaptations spécifiques à la méiose. Le fait que ce mécanisme de réparation soit favorisé sous-entend l'inhibition d'autres mécanismes de réparation, comme la jonction des extrémités non-homologues (Adamo *et al*, 2010; Lemmens *et al*, 2013; Smolikov *et al*, 2007a).

Après la cassure double-brin, les extrémités 5' sont retranchées par l'exonucléase MRE-11 (Yin & Smolikove, 2013), ce qui permet de générer deux extrémités 3' sortantes, qui se font recouvrir par la recombinaise RAD-51 (Alpi *et al*, 2003; Colaiacono *et al*, 2003; Petalcorin *et al*, 2006). Cette dernière favorise l'invasion de la matrice d'ADN intacte par l'une des extrémités 3', ce qui aboutit à la formation d'un duplex d'ADN. La matrice de réparation favorisée durant la méiose est le chromosome homologue, plutôt que la chromatide sœur, à cause des protéines associées aux axes. Après réparation, le duplex peut être désassemblé par des hélicases (Paques & Haber, 1999). L'ADN simple-brin alors relâché peut s'hybrider avec l'autre extrémité sortante, ce qui aboutit à la réparation de la cassure sans formation d'enjambement. De manière alternative, les deux extrémités 3' sortantes peuvent s'hybrider avec leur séquence complémentaire sur le chromosome homologue, et la structure peut être stabilisée par des facteurs pro-enjambements. Ces

structures sont appelées des chiasm, et leur résolution nécessite le clivage par des enzymes à activité résolvasse, en anaphase I. Chaque paire de chromosomes homologues doit recevoir un enjambement pour favoriser leur alignement et leur ségrégation.

C'est aussi dans cette région de la gonade que des cellules germinales sont éliminées par apoptose pour transmettre des nutriments et autres éléments cytoplasmiques aux ovocytes (Gumienny *et al*, 1999; Wolke *et al*, 2007). En outre, l'homologue de la protéine kinase régulée par un signal extracellulaire (ERK), MPK-1, est requise pour la progression des cellules germinales dans le stade pachytène (Lee *et al*, 2007; Robinson-Thiewes *et al*, 2021).

4.2.3. Après le coude, stades diplotène et diakinèse : différenciation des bivalents.

Aux stades diplotène et diakinèse (**Figure I-6**), les chromosomes sont remodelés et condensés, ce qui aboutit à la formation de bivalents – deux chromosomes homologues appariés et fortement condensés, maintenus par la cohésion des chromatides sœurs et par l'enjambement. Les ovocytes s'arrêtent ensuite au stade de la diakinèse, jusqu'à ce qu'ils soient activés et fécondés, ce qui permet de déclencher l'achèvement de la méiose (**voir section 5**).

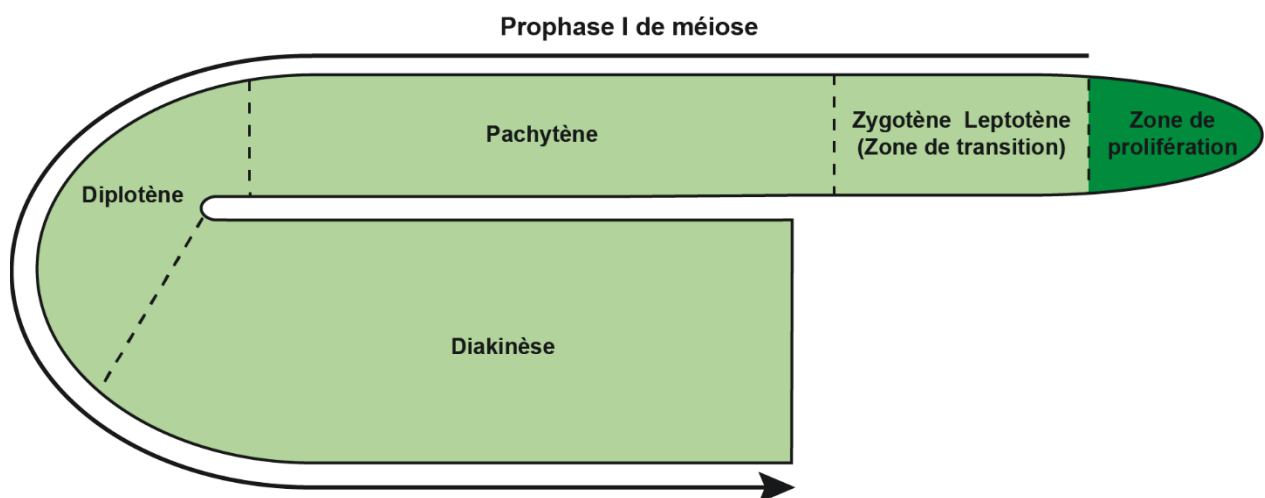


Figure I-6. Organisation spatiale de la méiose dans les gonades hermaphrodites. Schématisation simplifiée d'une gonade antérieure. Vert foncé, compartiment mitotique ; vert clair, compartiment méiotique. Pointillés, délimitation approximative des différentes zones de la lignée germinale. Les cellules progressent dans la prophase I de méiose de la gonade distale vers la proximale. Antérieur, à gauche ; dorsal, en haut. Adaptée de (Hillers *et al*, 2017).

En présence de spermatozoïdes, les ovocytes sont activés, ovulés et fécondés, ce qui permet d'achever la méiose, et d'éliminer le matériel génétique excédentaire dans les globules polaires.

5. Croissance, maturation et ovulation des ovocytes

5.1. La croissance des ovocytes

Les ovocytes croissent dans la région proximale de la gonade, où ils accumulent du vitellus – des particules lipoprotéiques – qui sont les réserves énergétiques pour les futurs embryons. Les vitellogénines, les protéines qui composent le vitellus, sont synthétisées dans l'intestin (Kimble & Sharrock, 1983) et sécrétées dans le pseudocoelome, une cavité remplie de liquide dans lequel baignent les organes internes. Les particules de vitellus passent au travers de la lame basale des gonades, et traversent les pores des cellules de la gaine gonadique, avant d'être endocytées par les ovocytes, où elles sont stockées dans des granules (Hall *et al.*, 1999). L'endocytose du vitellus requiert le récepteur RME-2, un membre de la famille des récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (Grant & Hirsh, 1999), dont l'expression est contrôlée par GLD-1 (Lee & Schedl, 2001). Des flux cytoplasmiques dépendants du cytosquelette d'actine, de la région distale vers la région proximale, permettent également de redistribuer les nutriments des cellules germinales mortes par apoptose au stade pachytène vers les ovocytes en croissance (Gumienny *et al.*, 1999; Wolke *et al.*, 2007).

5.2. La maturation des ovocytes

5.2.1. Le signal protéine majeure du sperme

Une étude pionnière a montré que des signaux en provenance des spermatozoïdes favorisent l'activation et la maturation des ovocytes, de manière indépendante à la fécondation (McCarter *et*

al, 1999). Dans les hermaphrodites féminisés, l'ovocyte le plus proximal (aussi appelé ovocyte -1) est activé à une fréquence très faible ($< 0,1$ maturation par gonade par heure). L'accouplement de ces vers féminisés avec des mâles sauvages, ou ayant des spermatozoïdes incompetents pour la fécondation est suffisant pour restaurer un taux normal de maturation des ovocytes (aux alentours de 2,5 maturations par gonade par heure). De la même manière, l'injection d'un milieu de culture prétraité avec des spermatozoïdes, ou de lysats de spermatozoïdes, dans des simples mutants féminisés *fog-2* aboutit à l'augmentation des fréquences de maturation des ovocytes et de contraction des cellules de la gaine gonadique. Les composés responsables de l'augmentation de ces fréquences ont été purifiés par chromatographie liquide à haute performance, et analysés par spectrométrie de masse. Cette analyse a montré qu'un seul facteur, la protéine majeure du sperme (PMS), était présent dans les échantillons. L'injection d'anticorps bloquants dirigés contre la PMS dans l'utérus d'hermaphrodites sauvages est suffisante pour diminuer la contractilité des cellules de la gaine et la fréquence des ovulations. Ainsi, La PMS, l'élément majeur du cytosquelette requis pour la motilité des spermatozoïdes (Italiano *et al*, 1996), joue un deuxième rôle dans la reproduction des hermaphrodites, car il fonctionne comme une hormone requise pour la maturation des ovocytes et la contraction des cellules de la gaine (Miller *et al*, 2001).

La signalisation MPK-1/ERK est requise pour la progression dans la prophase I de méiose et également pour la régulation de la maturation des ovocytes. En effet, MPK-1 est activée dans les ovocytes proximaux en présence de spermatozoïdes, et la fonction de la PMS est nécessaire et suffisante à cette activation (Miller *et al.*, 2001; Page *et al*, 2001).

5.2.2. Intégration de la protéine majeure du sperme par les cellules de la gaine gonadique

Après l'identification du signal paracrine sécrété par les spermatozoïdes, des études ont investigué comment les cellules de la gaine et les ovocytes étaient capables de l'intégrer et d'y

répondre. Une avancée dans la compréhension de ce mécanisme fut l'identification du récepteur à activité tyrosine kinase de la famille Eph, VAB-1, un des récepteurs de la PMS (Miller *et al*, 2003). Les simples mutants *vab-1*($\emptyset$) sont tout de même capables de répondre à la PMS, ce qui sous-entend l'existence d'autres récepteurs. Le gène *vab-1* fonctionne en parallèle d'une voie de signalisation dans la gonade somatique (Miller *et al.*, 2003) contrôlée par le gène à boîte homéotique de la famille POU, *ceh-18* (Greenstein *et al*, 1994; Rose *et al*, 1997). Ces deux voies inhibent la signalisation MPK-1/ERK et la maturation des ovocytes dans les hermaphrodites sauvages et féminisés. La maturation des ovocytes nécessite l'inhibition de VAB-1 et CEH-18 par la PMS, si bien que les doubles mutants *vab-1; ceh-18* ne sont plus dépendant de la présence de spermatozoïdes pour initier la maturation des ovocytes. La maturation fonctionne donc de manière similaire à un point de contrôle mitotique (Hartwell & Weinert, 1989). Ce mécanisme confère probablement un avantage évolutif en préservant des ovocytes qui ont été énergétiquement coûteux à produire, quand aucun spermatozoïde n'est disponible pour la fécondation.

5.2.3. Les protéines OMA favorisent la maturation de manière redondante

D'autres régulateurs de la maturation des ovocytes ont été identifiés chez *C. elegans*. Entre-autres, les deux protéines à doigts de zinc OMA-1 et OMA-2 stimulent de manière redondante la maturation de l'ovocyte et son ovulation (Detwiler *et al*, 2001). Le signal PMS stimule la protéine activatrice (G_{as}) GSA-1, et inhibe la protéine inhibitrice (G_{ai}) GOA-1 dans les cellules de la gaine gonadique, ce qui conduit à l'activation de l'adénylate cyclase ACY-4, à la production d'adénosine monophosphate cyclique et à l'activation de la protéine kinase A. Cette cascade aboutit à l'activation d'OMA-1 et OMA-2 dans l'ovocyte, ce qui favorise sa maturation (Govindan *et al*, 2009; Kim *et al*, 2012). Dans les doubles mutants *oma-1; oma-2*, l'activation de MPK-1/ERK n'est pas maintenue dans les ovocytes proximaux, et il n'y a pas de rupture de l'enveloppe nucléaire.

Les cibles d'OMA-1 et OMA-2 restent à identifier, bien que les deux pourraient agir en amont des régulateurs du cycle cellulaire WEE-1.3 et CDK-1 (Detwiler *et al.*, 2001). Étant donné qu'OMA-1 et OMA-2 sont des protéines à doigts de zinc, il est également probable qu'elles contrôlent la traduction d'ARNm.

5.3. Le contrôle de l'ovulation

Le mécanisme de l'ovulation chez *C. elegans* est un modèle intéressant pour étudier comment un signal traverse plusieurs tissus pour aboutir à une réponse biologique. En effet, l'ovulation nécessite l'action coordonnée des ovocytes, des cellules de la gaine gonadique – qui ont des propriétés semblables aux cellules musculaires lisses – et de la spermathèque. Au cours de l'ovulation, les cellules de la gaine proximales se contractent rapidement, la spermathèque distale se dilate et les cellules de la gaine tirent la spermathèque vers l'ovocyte -1. L'ovocyte en maturation contrôle sa propre ovulation de en modulant la contraction des cellules de la gaine, ce qui aboutit à une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des contractions durant l'ovulation, et aboutit à la dilatation de la spermathèque (McCarter *et al.*, 1999). Une étude a suggéré que la dilatation de la spermathèque est contrôlée par la signalisation du facteur de croissance épidermique (EGF). En effet, le ligand LIN-3, qui serait sécrété par les ovocytes en maturation, activerait le récepteur LET-23 à la surface des cellules de la spermathèque distale (Clandinin *et al.*, 1998).

Un gain de fonction dans *itr-1* et une perte de fonction dans *lfe-2* ont été isolés dans des criblages supprimeurs du phénotype de stérilité des simples mutants *let-23*. Les gènes *itr-1* et *lfe-2* codent pour un récepteur à l'inositol-(1, 4, 5)-triphosphate (IP₃) et une protéine kinase qui phosphoryle l'IP₃ (Clandinin *et al.*, 1998), ce qui suggère que la dilatation de la spermathèque requiert le relargage d'ions calcium (Ca²⁺) dans le cytosol. Ces résultats sont corroborés par la perte de fonction de *plc-1* – codant pour un homologue de la PLC ϵ – qui aboutit à des défauts d'entrée

et de sortie de la spermathèque (Kariya *et al*, 2004; Yin *et al*, 2004). La régulation du métabolisme de l'IP₃ médiée par LET-23 joue aussi un rôle dans la contraction des cellules de la gaine proximale au cours de l'ovulation (Yin *et al.*, 2004).

L'activation des ovocytes en l'absence de fécondation aboutit à la formation d'ovocytes endomitotiques (Iwasaki *et al*, 1996). En effet, un ovocyte activé retenu dans la gonade subit plusieurs étapes consécutives de rupture d'enveloppe nucléaire et de phase S, ce qui le rend polyploïde. Une classe de gènes qui aboutit à la formation d'ovocytes endomitotiques a été mise en évidence dans la littérature, et inclut des gènes essentiels à la contractilité tels que *mup-2* (Myers *et al*, 1996), *mel-11* (Wissmann *et al*, 1999), la tropomyosine et la troponine C (Ono & Ono, 2004) ou encore des gènes impliqués dans le développement de la spermathèque (Aono *et al*, 2004; Kostic *et al*, 2003) (Aono *et al.*, 2004; Kostic *et al.*, 2003).

La croissance, la maturation et l'ovulation des ovocytes dépendent donc des tissus de la lignée somatique. Une autre régulation de la lignée germinale par un tissu somatique est la maintenance de l'identité mitotique par la CED.

6. Maintenance de l'identité mitotique des cellules souches germinales chez l'hermaphrodite

6.1. La cellule de l'extrémité distale exprime les ligands pour le récepteur Notch

La zone de prolifération se situe dans la partie la plus distale des gonades, adjacente à la CED. Cette dernière forme le microenvironnement, ou niche, des CSG. La CED permet de maintenir le caractère indifférencié des CSG au cours du développement et la phase adulte (Crittenden *et al*, 2003; Kimble & Simpson, 1997; Seydoux *et al*, 1990). En effet, l'ablation des cellules de l'extrémité distale à l'aide d'un laser aboutit à l'entrée en méiose – en d'autres termes,

à la différenciation – constitutive des CSG (Kimble & White, 1981). De surcroît, la duplication ou la relocalisation de la CED permet d'induire de nouvelles CSG de manière ectopique et établit une nouvelle polarisation de la lignée germinale (Kimble & White, 1981; Kipreos *et al*, 2000; Lam *et al*, 2006). La CED maintient l'activité mitotique des CSG par le biais d'un mécanisme d'inhibition latérale impliquant la signalisation Notch. Le génome de *C. elegans* code pour deux ligands Notch à simple domaine transmembranaires de la famille Delta-Serrate-LAG-2, APX-1 et LAG-2 (Henderson *et al*, 1994; Nadarajan *et al*, 2009; Tax *et al*, 1994). LAG-2, qui est exprimée par la CED, active la GLP-1 germinale chez les larves précoces, tandis qu'APX-1 et LAG-2 activent GLP-1 de manière redondante chez les larves tardives et l'adulte (Hubbard & Schedl, 2019). (**Figure I-7**). Une perte de fonction de *lag-2*, de la même manière qu'une ablation laser de la CED, conduit à la différenciation constitutive des CSG.

6.2. Le récepteur GLP-1 est exprimé à la surface des cellules souches germinales

LIN-12 et GLP-1 sont les deux récepteurs de la voie Notch présents chez *C. elegans*. Malgré leur redondance fonctionnelle au cours du développement de certains tissus somatiques (Fitzgerald *et al*, 1993; Lambie & Kimble, 1991; Priess, 2005), la déplétion de LIN-12 n'influence pas la taille de la zone de prolifération, ce qui implique que GLP-1 est le seul récepteur requis dans le maintien du caractère indifférencié des cellules germinales (Pekar *et al*, 2017). Le récepteur GLP-1 est exprimé à la surface de toutes les cellules de la zone de prolifération, mais son activation est restreinte aux 5 rangées des cellules les plus distales, où la concentration en ligand est la plus élevée (**Figure I-7**). GLP-1 est requis pour maintenir le caractère mitotique des CSG distales. En effet, de la même manière que la perte de fonction de *lag-2* ; la perte de *glp-1* aboutit à la différenciation constitutive des CSG (Austin & Kimble, 1987). L'utilisation d'allèles thermosensibles a permis de démontrer que ce phénotype peut survenir à la fois au cours du développement larvaire et chez

l'adulte (Austin & Kimble, 1987; Kodoyianni *et al*, 1992). Ces mutants réduction de fonction de *glp-1* sont fertiles à des températures permissives, mais leur zone de prolifération est de taille réduite. Fait intéressant, ces mutants ont une vitesse de progression dans le cycle cellulaire similaire aux individus sauvages. Ce résultat suggère que GLP-1 joue un rôle dans le maintien de l'identité mitotique des CSG, mais que leur taux de prolifération est contrôlé par d'autres facteurs (Fox & Schedl, 2015; Lee *et al*, 2016; Michaelson *et al*, 2010) (**voir section 7**)

À contrario, un gain de fonction de *glp-1* se traduit par l'impossibilité pour les CSG d'entrer en méiose et aboutit à la formation de tumeurs bénignes constituées de cellules germinales indifférenciées (Berry *et al*, 1997; Fitzgerald & Greenwald, 1995; Henderson *et al*, 1997; Pepper *et al*, 2003). Ainsi, l'activité de GLP-1 est nécessaire et suffisante pour maintenir l'identité mitotique des CSG et inhiber leur entrée en méiose.

6.3. La voie Notch active la transcription de LST-1 et SYGL-1 dans les cellules souches germinales

Lorsqu'APX-1 ou LAG-2, exprimés par la CED, interagissent physiquement avec GLP-1 à la surface des CSG, le complexe γ -sécrétase peut accéder au domaine transmembranaire du récepteur et le cliver. Ceci aboutit à la dissociation du domaine intracellulaire du récepteur et à sa translocation au noyau. Le domaine intracellulaire s'associe alors aux facteurs de transcription LAG-1 et SEL-8 (Christensen *et al*, 1996; Lambie & Kimble, 1991) (**Figure I-7**). Ce complexe active la transcription de deux gènes cibles principaux dans la lignée germinale, *lst-1* et *sygl-1* (Kershner *et al*, 2014; Lee *et al.*, 2016).

LST-1 et SYGL-1 sont deux facteurs redondants nécessaires pour maintenir l'activité mitotique des CSG (**Figure I-7**). En effet, tandis que les simples mutants *lst-1* ou *sygl-1* ont un phénotype superficiellement sauvage, les doubles mutants phénocopient l'entrée en méiose

constitutive des simples mutants perte de fonction de *lag-2* ou *glp-1* (Shin *et al*, 2017). À contrario, la surexpression pan-germinale de LST-1 ou SYGL-1 phénocopie le gain de fonction de *glp-1*, à savoir le défaut d'entrée en méiose et la formation d'une tumeur bénigne constituée de cellules indifférenciées. Étant donné que la perte de fonction de *glp-1* ne permet pas d'induire la différenciation des cellules immatures constituant les tumeurs germinales dans les gains de fonction *lst-1* ou *sygl-1*, ces deux facteurs fonctionnent en aval de *glp-1* (et donc de *lag-2*) (Kershner *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2017). Cette interaction est corroborée par la présence de plusieurs sites de liaison de LAG-1 au sein des promoteurs de *lst-1* et de *sygl-1* et par le fait que la transcription de *lst-1* et *sygl-1* requiert la signalisation Notch (Kershner *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016).

6.4. LST-1 et SYGL-1 agissent de concert avec FBF-1 et FBF-2 pour maintenir la prolifération et inhiber l'entrée en méiose des cellules souches germinales

La décision entre le maintien de la mitose et l'entrée en méiose fait intervenir la régulation post-transcriptionnelle des ARNm. FBF-1 et FBF-2 sont deux protéines redondantes requises pour le maintien du caractère mitotique des CSG au cours du développement larvaire ainsi que dans les adultes (Crittenden *et al*, 2002) (**Figure I-7**). Dans les doubles mutants *fbf-1; fbf-2*, les cellules germinales cessent de proliférer au cours du stade L4, et se différencient constitutivement en spermatozoïdes, un phénotype semblable à la perte de fonction de *glp-1* (Crittenden *et al.*, 2002; Lamont *et al*, 2004). FBF-1 et FBF-2 sont deux protéines de la famille Pumilio/FBF qui se lient aux ARNms possédant des séquences de liaison spécifiques dans leur région 3' UTR pour inhiber leur traduction (Bernstein *et al*, 2005; Eckmann *et al*, 2004; Wickens *et al*, 2002; Zhang *et al.*, 1997). Fait intéressant, LST-1 et SYGL-1 peuvent former des complexes avec les protéines FBF. De plus, le maintien constitutif de l'identité mitotique des CSG, observable dans un double gain de fonction ectopique de *lst-1* et *sygl-1*, est supprimé par la perte de fonction des FBF (Shin *et al.*,

2017). Les protéines FBF régulent l'entrée en méiose par le biais de deux mécanismes. Premièrement, elles répriment au niveau post-transcriptionnel l'expression de protéines de maintenance de la structure des chromosomes impliquées dans les étapes précoces de la méiose, telles que HIM-3 ou les protéines du CSY, SYP-2 et SYP-3 (Kershner & Kimble, 2010; Merritt *et al*, 2008; Merritt & Seydoux, 2010). Deuxièmement, les FBF régulent les ARNm de protéines requises pour l'entrée en méiose telles que GLD-1, GLD-2 et PROM-1.

LST-1, SYGL-1 et les FBF répriment de manière post-transcriptionnelle l'expression d'effecteurs de trois branches parallèles – GLD-1, GLD-2 et SCF^{PROM-1} – qui agissent de concert pour promouvoir l'entrée en méiose (**Figure I-7**). Les trois voies fonctionnent de manière partiellement redondante : la perte d'effecteurs de deux des trois voies est suffisante pour bloquer l'entrée en méiose des CSG, ce qui conduit à leur prolifération ectopique et à la formation de tumeurs germinales indifférenciées. Des tests d'épistasie ont montré que GLP-1, LST-1 et SYGL-1 agissent en amont de ces trois voies (Hubbard & Schedl, 2019). La signalisation Notch favorise donc le maintien de la mitose en inhibant l'entrée en méiose.

6.5. Les branches GLD-1, GLD-2 et SCF^{PROM-1} favorisent l'entrée en méiose de manière partiellement redondante

6.5.1. La branche GLD-1/NOS-3

GLD-1 est une protéine à domaine KH se liant aux ARNm (Jones & Schedl, 1995; Lee & Schedl, 2010). Les simples mutants *gld-1* hermaphrodites XX, mais pas les mâles XO, développent des tumeurs germinales indifférenciées. Les CSG des mutants *gld-1* sont capables d'entrer en méiose durant la période d'ovogenèse, mais sortent de la prophase I au stade pachytène pour retourner dans un cycle mitotique (Ellis & Kimble, 1995; Francis *et al*, 1995a; Francis *et al*, 1995b; Jones *et al*, 1996). À contrario, les mutants *gld-1*($\emptyset$), en combinaison avec une mutation d'un

effecteur de la branche GLD-2 ou SCF^{PROM-1}, aboutit également à un phénotype de tumeur indifférenciée, mais ce dernier est dû à une incapacité pour les CSG d'entrer en méiose (Hansen *et al.*, 2004a; Kadyk & Kimble, 1998; Mohammad *et al.*, 2018). Il est donc crucial de caractériser le mécanisme de genèse tumorigénèse pour décrire la fonction des gènes impliqués. GLD-1 est très faiblement exprimée dans les cellules distales, et son expression augmente d'un facteur vingt de manière plus proximale, avec un pic au niveau de l'entrée en prophase I de méiose (leptotène) (Brenner & Schedl, 2016; Jones *et al.*, 1996). Une expression ectopique de GLD-1 dans les CSG distales est suffisante pour induire l'entrée en méiose (Brenner & Schedl, 2016; Crittenden *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2004b; Shin *et al.*, 2017). GLD-1 est localisée dans le cytosol, et se fixe à la région 3' UTR de transcrits pour réprimer leur expression. Ces transcrits codent pour des protéines qui favorisent le maintien de la mitose ou inhibent l'entrée en méiose (Biedermann *et al.*, 2009; Jan *et al.*, 1999; Jungkamp *et al.*, 2011; Lee & Schedl, 2010; Marin & Evans, 2003; Theil *et al.*, 2018; Wright *et al.*, 2011). Environ 1000 ARNm-cibles de GLD-1 ont été identifiés, mais leur fonction n'a pas encore été caractérisée.

NOS-3 est une protéine se liant aux ARNm, homologue de la protéine Nanos de la drosophile et des mammifères (Kraemer *et al.*, 1999). La perte de fonction de *nos-3*, de la même manière que celle de *gld-1*, en combinaison avec la perte de fonction d'un effecteur de la branche GLD-2 ou SCF^{PROM-1} est suffisante pour bloquer l'entrée en méiose des CSG. NOS-3 a donc été placé dans la même voie que GLD-1 (Hansen *et al.*, 2004b; Mohammad *et al.*, 2018). La localisation subcellulaire de NOS-3 est cytoplasmique, et son expression a été observée dans toute la lignée germinale. Bien que NOS-3 fonctionne avec les FBF pour inhiber la traduction du transcrit *fem-3* dans le déterminisme sexuel (Arur *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 1997) (**voir section 3**), la perte de fonction de *nos-3* supprime le phénotype d'entrée en méiose constitutif des doubles mutants *fbf-1*; *fbf-2*, ce qui signifie que NOS-3 et les FBF agissent de manière antagoniste dans la régulation

de l'entrée en méiose (Eckmann *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2004b). En outre, NOS-3 favorise l'accumulation de GLD-1 dans la zone de prolifération proximale de manière redondante avec la branche GLD-2. Les cibles de NOS-3 qui favorisent l'accumulation de GLD-1 et l'entrée en méiose restent encore à identifier.

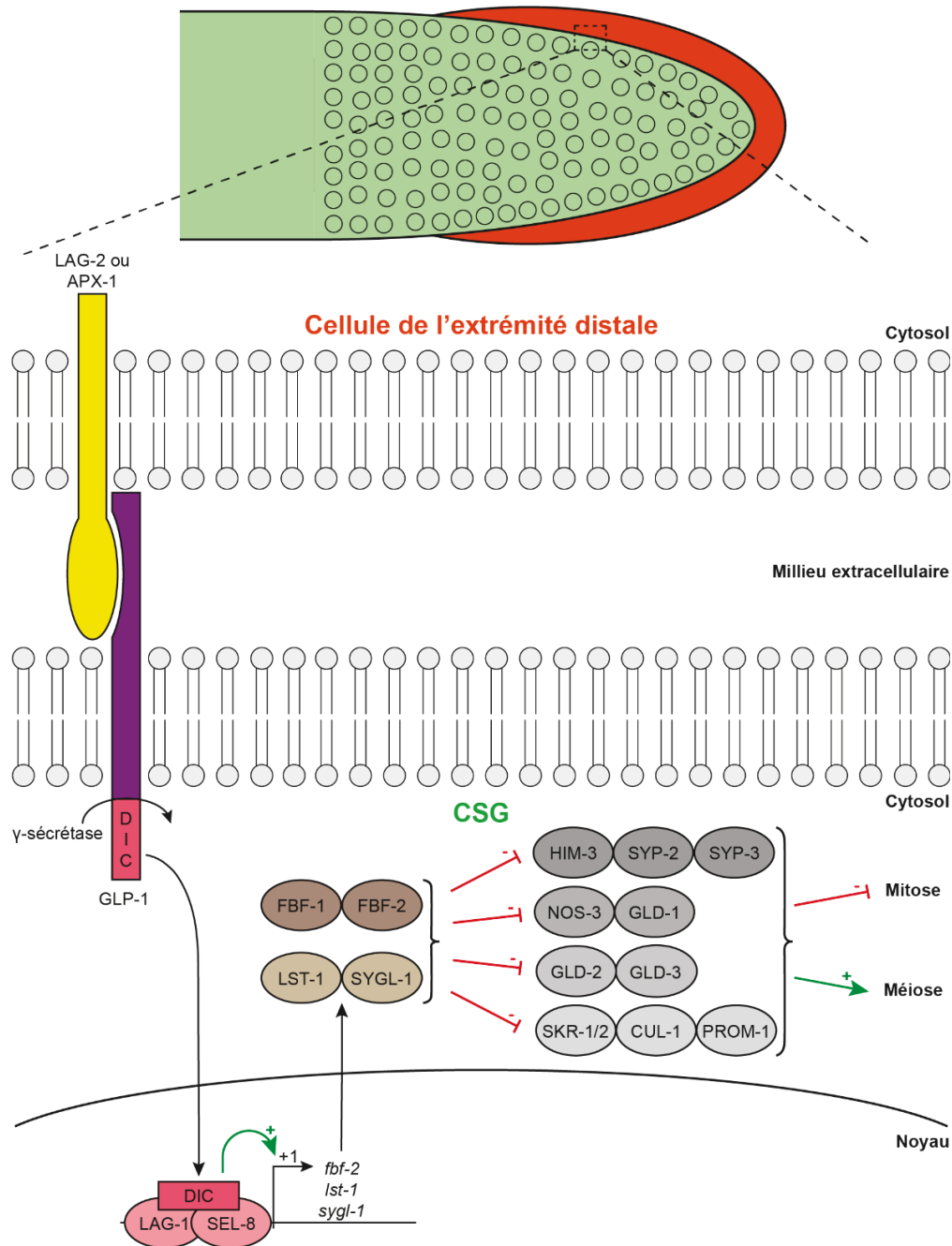


Figure I-7. La cellule de l'extrémité distale maintient l'identité mitotique des cellules souches germinales par le biais de la signalisation Notch. Flèche verte, stimulation ; barre rouge, inhibition. Jaune, ligand ; violet, récepteur ; rose, facteur de transcription ; marron et gris, protéines avec d'autres fonctions. CSG, cellule souche germinale ; DIC, domaine intracellulaire de GLP-1. L'interaction entre le ligand et le récepteur aboutit au clivage du DIC. Celui-ci agit comme un facteur de transcription, en s'associant avec LAG-1 et SEL-8, pour stimuler l'expression de FBF-2, LST-1 et SYGL-1. Ces protéines répriment alors l'expression de facteurs favorisant l'entrée en méiose. Adaptée de (Hubbard & Schedl, 2019).

6.5.2. La branche GLD-2/GLD-3

GLD-2 est une polyA polymérase cytoplasmique (Kadyk & Kimble, 1998; Nousch *et al*, 2017; Wang *et al*, 2002) qui agit de concert avec GLD-3, une protéine de la famille Bicaudal-C qui se lie aux ARNm (Eckmann *et al.*, 2004; Eckmann *et al.*, 2002; Suh *et al*, 2009; Suh *et al*, 2006). GLD-2 et GLD-3 s'associent pour se lier à des ARNm spécifiques (comme le transcrit *gld-1*), ce qui stimule l'activité polyA polymérase de GLD-2 (Schmid *et al*, 2009; Suh *et al.*, 2006). En favorisant la stabilisation et la traduction du transcrit *gld-1* par l'élongation de sa queue polyA, GLD-2 et GLD-3 sont des régulateurs positifs de l'accumulation de GLD-1 dans la zone de prolifération proximale (Brenner & Schedl, 2016; Hansen *et al.*, 2004b; Millonigg *et al*, 2014; Nousch *et al*, 2014; Suh *et al.*, 2009; Suh *et al.*, 2006). Cependant, les CSG des simples mutants *gld-1* ou *gld-2*, mais pas celles des doubles mutants, sont capables d'entrer en méiose, ce qui suggère que GLD-2 régule d'autres cibles que *gld-1*. Plus de 500 ARNm cibles de GLD-2 ont été identifiés, mais il reste à déterminer lesquels permettent de promouvoir l'entrée en méiose indépendamment de *gld-1*.

6.5.3. La branche SCF^{PROM-1}

SCF^{PROM-1} est un complexe E3 ubiquitine ligase constitué de SKR1/2, CUL-1 et PROM-1 (Jantsch *et al*, 2007; Kipreos *et al*, 1996; Nayak *et al*, 2002). Ce complexe favorise l'entrée en méiose en régulant deux processus biologiques distincts (Mohammad *et al.*, 2018). Premièrement, SCF^{PROM-1} inhibe les protéines du cycle cellulaire mitotique (incluant CYE-1, WAPL-1, KNL-2 et CDC-6) à la frontière entre la zone de prolifération et la zone de transition. CYE-1 est directement ubiquitinylé par SCF^{PROM-1}, ce qui induit sa dégradation par le protéasome. En revanche, le mécanisme de régulation de l'expression des autres protéines par SCF^{PROM-1}, et sa nature directe ou indirecte, restent à élucider. En l'absence de SCF^{PROM-1}, l'expression des protéines du cycle

cellulaire mitotique n'est pas correctement réprimée lors de l'entrée en méiose, et leur patron d'expression est étendu en région distale. La perte de fonction d'un composant du complexe SCF^{PROM1} aboutit à une accumulation ectopique de cellules bloquées en mitose. Une seconde mutation dans un effecteur de la voie GLD-1 ou GLD-2 induit une prolifération ectopique, qui est épistatique à l'entrée en méiose prématurée des mutants perte de fonction de *glp-1*. SCF^{PROM-1} est également requis pour l'appariement des chromosomes homologues lors de l'entrée en méiose. En l'absence de SCF^{PROM-1}, plusieurs événements nécessaires pour l'appariement des chromosomes (et dépendants de la protéine CHK-2) ne peuvent se produire, alors que d'autres événements liés à l'entrée en méiose se déroulent normalement, comme l'expression de la protéine HIM-3, ou l'accumulation de GLD-1.

En considérant tous ces résultats et les patrons d'expression des différents interacteurs, un modèle de la maintenance de la mitose et de la décision d'entrer en méiose a été proposé. Dans les CSG distales en contact avec la CED, le ligand Notch de la famille Delta-Serrate-LAG-2 (LAG-2 ou APX-1) se lie au récepteur GLP-1, ce qui aboutit au clivage du domaine intracellulaire. Ce domaine est transloqué au noyau, où il agit comme un co-activateur de la transcription avec LAG-1 et SEL-8, ce qui permet d'activer la transcription de *lst-1*, *sygl-1* et *fbf-2* dans les 5 premières rangées de cellules distales. L'accumulation de SYGL-1 se prolonge, et s'étend généralement jusqu'aux 10-13 diamètres cellulaires les plus distaux. SYGL-1 et LST-1, avec les protéines FBF, inhibent les différentes voies qui favorisent l'entrée en méiose. Étant donné que les FBF sont exprimées dans toute la zone de prolifération, l'entrée en méiose est déterminée par l'expression de LST-1 et SYGL-1. Dans les diamètres cellulaires plus proximaux, l'absence de LST-1 et SYGL-1 permet de lever l'inhibition des trois branches principales favorisant l'entrée en méiose (Hubbard & Schedl, 2019; Kimble & Crittenden, 2005) (**Figure I-7**).

Nous avons vu que la voie Notch est requise pour maintenir l'identité mitotique des CSG. D'autres voies de signalisation sont nécessaires pour contrôler leur taux de prolifération (Fox & Schedl, 2015; Lee *et al.*, 2016; Michaelson *et al.*, 2010).

7. Contrôle du taux de prolifération des cellules souches germinales chez l'hermaphrodite adulte

7.1. Régulation de la prolifération des cellules souches germinales par des facteurs systémiques

Nous avons vu que les CSG résident au sein de leur microenvironnement et reçoivent des signaux inhibiteurs de la différenciation – autrement dit, de leur entrée en méiose – provenant de la CED. Sous l'influence de divers autres signaux, les CSG peuvent ainsi proliférer à un taux plus ou moins élevé ou encore entrer en quiescence, un état réversible caractérisé par l'arrêt du cycle cellulaire. Ces signaux peuvent être de provenance local ou systémique, et correspondent généralement à des facteurs de croissance.

Dépendamment de la prise alimentaire, de nombreux peptides homologues à l'insuline (INS-1 à INS-39 et DAF-28) sont synthétisés par le système nerveux de *C. elegans*. Ces peptides peuvent être des agonistes ou des antagonistes du récepteur DAF-2/IGF1R, ce qui permet une modulation complexe de la signalisation insuline/IGF1R (SII) (Zhu & Chin-Sang, 2024). La liaison d'un peptide agoniste conduit à la transautophosphorylation de DAF-2, au recrutement de IST-1/IRS et à l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI₃K), constituée des sous-unités catalytique AGE-1 et régulatrice AAP-1. La PI₃K phosphoryle le phosphatidylinositol 4-5-bisphosphate (PIP₂) en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃), ce qui favorise le recrutement de la kinase dépendante du PIP₃, PDK-1. PDK-1 phosphoryle et active AKT-1 et AKT-

2, qui phosphorylent et inhibent à leur tour le facteur de transcription à boîte « forkhead » DAF-16/FOXO de manière cellulaire autonome dans les CSG pour stimuler leur prolifération (Michaelson *et al.*, 2010 ; Narbonne *et al.*, 2017) (**Figure I-8**). Une étude récente a néanmoins remis en cause ce paradigme, en suggérant une fonction somatique pour la SII dans le contrôle de la prolifération des CSG (Cheng *et al.*, 2024). Le contrôle de la prolifération des CS par la voie de SII est conservé chez les invertébrés (Shim *et al.*, 2013).

A contrario, la SII est réduite lorsque l'environnement est pauvre en nutriments. Chez *C. elegans*, l'absence de nourriture après l'éclosion empêche l'activation de la SII et aboutit à un arrêt réversible du développement au stade L1. Si la réduction survient au cours du stade L1, la larve entre dans un stade alternatif appelé L2d. Si les conditions restent défavorables, les L2d progressent vers le stade « dauer », un type de diapause caractérisé par l'arrêt réversible du développement, une résistance accrue à toute forme de stress et une extension de la longévité (**voir section 2**). Le développement de l'individu restera interrompu tant qu'il n'aura pas trouvé une source suffisante de nutriments (Corsi *et al.*, 2015). Une caractéristique importante de la transition vers le stade diapause est l'établissement progressif d'un arrêt généralisé du cycle cellulaire. L'inhibition de la prolifération des CSG est régulée par les homologues de la phosphatase et homologue de la tensine (PTEN) et de la kinase B1 du foie (LKB1) – DAF-18 et PAR-4, respectivement ; ainsi que par la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK). Cette dernière est constituée de trois sous-unités : une catalytique et deux régulatrices. Les sous-unités catalytiques AAK-1 et AAK-2 de l'AMPK ont un effet additif dans la mise en place de la quiescence des CSG au stade « dauer » (Narbonne & Roy, 2006a). Ces protéines sont conservées et leurs homologues jouent également un rôle dans la régulation de la prolifération des CS. Par exemple, les suppresseurs de tumeur PTEN et LKB1 sont nécessaires pour maintenir la quiescence des CS hématopoïétiques murines (Gan *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006). Il a également été montré que la phosphorylation activatrice d'AAK-2 par LKB1 au

stade « durer » nécessite la protéine adaptatrice STRD-1/STRAD (Narbonne *et al*, 2010). Le mécanisme permettant à DAF-18/PTEN, PAR-4/LKB1 et l'AMPK de favoriser la quiescence des CSG et d'antagoniser la SII reste à élucider. De surcroît, la prolifération des CS doit être finement régulée dans l'espace et dans le temps en fonction du contexte physiologique et donc du besoin en cellules différenciées.

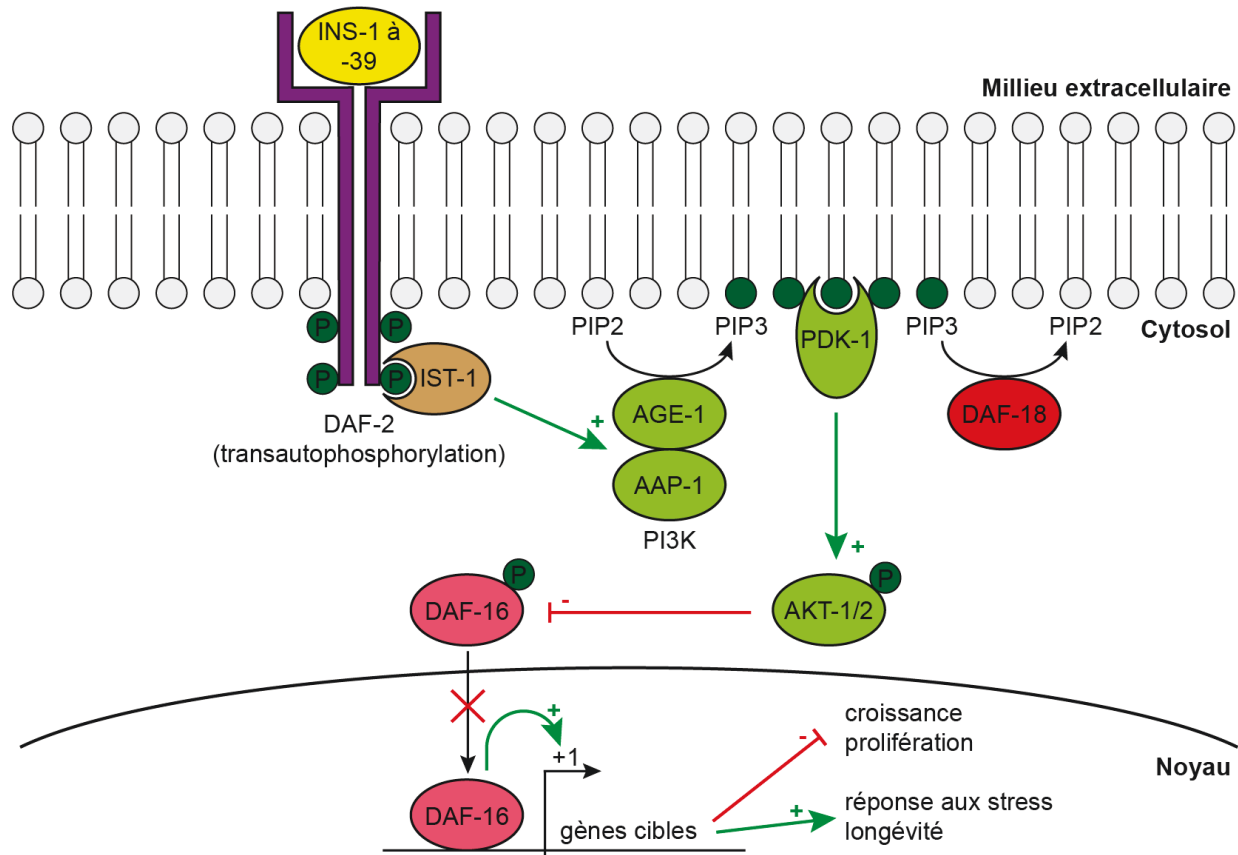


Figure I-8. La signalisation de l'insuline maintient le taux de prolifération des cellules souches germinales élevé de manière systémique. Flèche verte, stimulation ; barre rouge, inhibition. Jaune, ligands ; violet, récepteur, vert : kinases ; rouge, phosphatase ; rose, facteur de transcription ; beige, protéine avec une autre fonction. Cercles vert foncé, groupements phosphate. Les peptides semblables à l'insuline se lient au récepteur DAF-2, ce qui aboutit à sa transautophosphorylation et au recrutement de IST-1. Cette dernière active la PI3K, qui phosphoryle le PIP₂ en PIP₃, favorisant le recrutement de PDK-1. PDK-1 phosphoryle et active AKT-1/2, qui à son tour phosphoryle et inhibe le facteur de transcription DAF-16. DAF-18 agit comme un antagoniste de cette voie en déphosphorylant le PIP₃ en PIP₂. Adaptée de (Narbonne & Roy, 2006b).

7.2. Régulation de l'homéostasie proliférative des cellules souches germinales

Chez *C. elegans*, nous avons vu que la prolifération des CSG est couplée à la SII. Un autre facteur entre en compte à l'échelle tissulaire : la demande en ovocytes (la progéniture différenciée des CSG). Quand la quantité de spermatozoïdes produite par la larve est épuisée, l'ovocyte le plus

proximal ne reçoit plus de signal PMS, et ne peut par conséquent plus être activé, ovulé et fécondé. Les ovocytes au stade diakinèse s'accumulent alors dans la gonade proximale, bloqués physiquement par l'ovocyte -1 immature, lui-même retenu par la valve distale de la spermathèque qui demeure contractée (Deng *et al.*, 2025). Cette situation active un rétrocontrôle homéostatique pour inhiber la prolifération des CSG, dans le but de stopper la production de nouveaux ovocytes et ainsi éviter la perte de cellules différenciées, dont la production est énergétiquement coûteuse (Cinquin *et al.*, 2016; Narbonne *et al.*, 2015, 2017) (**Figure I-9A**). Le taux de prolifération des CSG chez *C. elegans* peut être évalué en quantifiant leur indice mitotique (IM). Il s'agit du nombre de cellules en phase M dans la zone de prolifération (pH3[S10]^+ et WAPL-1^+ ou HIM-3^-) divisé par le nombre total de cellules dans la zone de prolifération (WAPL-1^+ ou HIM-3^-). Plus l'IM est élevé, plus le taux de prolifération des CSG est élevé. En définitive, l'IM des individus sauvages chute drastiquement à partir du stade adulte jour 4 (A4, L4 + 96h à 25°C), ce qui coïncide avec l'épuisement des spermatozoïdes et l'accumulation des ovocytes au stade diakinèse (Narbonne *et al.*, 2015).

Des mutations féminisantes (*fem* ou *fog*) empêchent la formation de spermatozoïdes (Barton & Kimble, 1990; Kimble *et al.*, 1984) (**voir section 3**), ce qui mène à l'inhibition précoce de la prolifération des CSG, et à un faible IM, dans les adultes au stade A1 (L4 + 24h à 25°C), et ce en dépit d'une prise alimentaire constante et de l'activation de la SII (Cinquin *et al.*, 2016; Narbonne *et al.*, 2015) (**Figure I-9B**). L'IM d'hermaphrodites féminisés *fog-1* croisés par des mâles sauvages est similaire à celui des hermaphrodites sauvages, ce qui indique que le rétrocontrôle homéostatique est un mécanisme réversible (Narbonne *et al.*, 2015). De manière semblable aux mutants *fog-1*, les ovocytes incompetents à la maturation qui s'accumulent dans les doubles mutants *oma-1*; *oma-2* induisent la signalisation homéostatique. En effet, les CSG des individus *ma-1*; *oma-2* ont un IM significativement réduit par rapport aux individus sauvages (**Figure I-9C**).

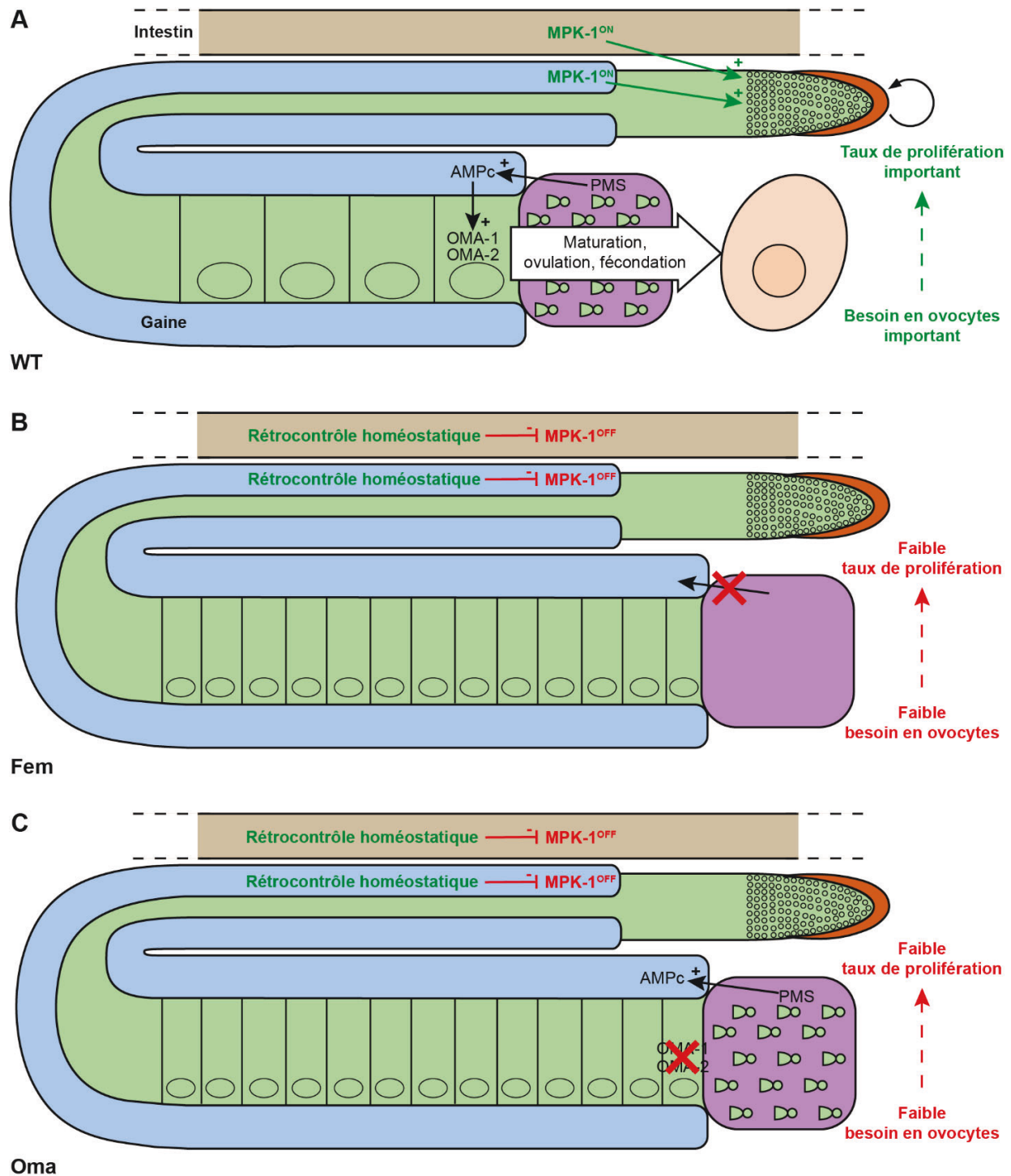


Figure 1-9. La signalisation homéostatique module localement l'activité de MPK-1 pour contrôler le taux de prolifération des cellules souches germinales. (A-C) Schématisation d'une gonade antérieure. Les organes et leur code couleur sont similaires à la figure 1-3B. Flèche verte, stimulation ; barre rouge, inhibition. Antérieur, à gauche ; dorsal, en haut (l'orientation est la même dans toute la figure). (A) AMPc, AMP cyclique ; PMS, protéine majeure du sperme. Les spermatozoïdes sécrètent la PMS, ce qui conduit à l'activation d'OMA-1 et OMA-2 dans l'ovocyte le plus proximal. Ce dernier est ensuite ovulé et fécondé, et les CSG prolifèrent à un taux élevé pour subvenir à la demande en ovocytes, sous l'influence du MPK-1 somatique. (B) Lorsque les spermatozoïdes sont épuisés, où lorsque la lignée germinale est féminisée (Fem), les ovocytes ne sont plus maturés et ovulés ; ils s'accumulent dans la gonade proximale. Le rétrocontrôle homéostatique inhibe alors le MPK-1 somatique, ce qui aboutit à la quiescence des CSG. (C) Le rétrocontrôle homéostatique est également activé en aval de l'accumulation d'ovocytes lorsque ces derniers sont incompetents à la maturation (Oma) (Cinquin *et al.*, 2016; Hubbard & Greenstein, 2005; Narbonne *et al.*, 2015; Narbonne *et al.*, 2017).

Le rétrocontrôle homéostatique favorise la mise en quiescence des CSG en inhibant la signalisation MPK-1/ERK, qui est requise dans la gaine gonadique ou l'intestin, à partir d'où elle favorise la prolifération des CSG (Narbonne *et al.*, 2017; Robinson-Thiewes *et al.*, 2021) (Lloyd Venceslas Fotso Dzuna, *en préparation*) (**Figure I-9**). En effet, l'IM des mutants perte de fonction de *mpk-1* est significativement inférieur à celui des sauvages. Cette perte de fonction a un effet semblable à l'inhibition homéostatique de MPK-1 dans les mutants féminisés. Ainsi, lorsque de jeunes hermaphrodites sont élevés dans des conditions optimales de croissance et que les spermatozoïdes sont présents en abondance dans la spermathèque, la SII agit en concert avec la voie MPK-1/ERK pour fortement stimuler la prolifération des CSG. Une diminution de la SII ou de la signalisation MPK-1/ERK aboutit à une diminution du taux de prolifération des CSG. Le taux devient nul dans les doubles mutants *daf-2; mpk-1* ce qui suggère que la SII et la signalisation MPK-1/ERK stimulent la prolifération des CSG en parallèle (Narbonne *et al.*, 2017).

Certains effecteurs requis pour l'inhibition de la prolifération des CSG au stade « dauter » sont également impliqués dans le rétrocontrôle homéostatique de l'adulte. La mutation d'un gène codant pour l'un de ces effecteurs aboutit à une perte de la signalisation homéostatique, qui se traduit par un découplage entre l'abondance d'ovocytes et la prolifération des CSG. Ces mutations incluent des pertes de fonction de DAF-18/PTEN, PAR-4/LKB1 et AAK-1/PRKAA2. Dans les doubles mutants féminisés *fog-1; daf-18*, *fog-1; par-4* et *fog-1; aak-1*, l'ovocyte le plus proximal subit fréquemment une maturation spontanée, ce qui le fait entrer dans un cycle endomitotique en plus de favoriser son ovulation et sa ponte (**Figure I-11A**). Ainsi, le nombre d'ovocytes au stade diakinèse ainsi que l'IM de ces doubles mutants sont similaires aux individus sauvages. Par ailleurs, les doubles mutants *mpk-1; daf-18* ont un IM similaire à celui des *mpk-1*, ce qui signifie que *mpk-1* fonctionne en aval de *daf-18* dans la régulation des CSG (Narbonne *et al.*, 2017). À l'inverse, la perte de fonction de la sous-unité catalytique AAK-2 de l'AMPK dans le fond génétique *fog-1*

aboutit à une faible augmentation du nombre d'ovocytes corrélée à une faible diminution de l'IM en comparaison aux simples mutants *fog-1*. Ces résultats indiquent qu'AAK-1 est principalement responsable de la promotion de la quiescence homéostatique des CSG chez l'adulte, contrairement au mécanisme du stade « durer » nécessitant la fonction des deux sous-unités catalytiques de l'AMPK (Narbonne *et al.*, 2017).

La perte de fonction de la protéine adaptatrice PAR-5/14-3-3 aboutit également à la suppression du rétrocontrôle homéostatique. L'IM des doubles mutants *fog-1; par-5* est semblable à celui des individus sauvages. Comme c'est le cas pour *daf-18*, *par-4* et *aak-1*, la perte de fonction de *par-5* aboutit à la maturation et à l'ovulation spontanée de l'ovocyte le plus proximal dans le fond génétique *fog-1*. Cela suggère que ces quatre gènes agissent dans la même cascade homéostatique. Étant donné la forte similarité entre le site consensus de phosphorylation par l'AMPK et les sites consensus de liaison de PAR-5, il a été proposé que PAR-5 inhibe la signalisation MPK-1 en se liant aux sites phosphorylés par l'AMPK (Narbonne *et al.*, 2017).

La perte de fonction d'*aak-1* dans le fond génétique *oma-1; oma-2* est caractérisée par l'impossibilité de mettre en place la signalisation homéostatique, et aboutit donc à un IM similaire à celui des sauvages. Dans de tels triples mutants *aak-1; oma-1; oma-2*, bien que l'ovocyte le plus proximal ne puisse pas subir de maturation spontanée, les CSG continuent de proliférer et ce malgré l'accumulation d'ovocytes qui s'en suit. Ces individus se retrouvent rapidement remplis d'ovocytes arrêtés au stade diakinèse, qui s'accumulent sur plusieurs rangées dans la gonade, l'utérus, et parfois à l'extérieur des gonades, à cause de l'augmentation de la pression sur la paroi des organes et du bris de la lame basale. En d'autres mots, la perte d'un effecteur de la signalisation homéostatique dans le fond *oma-1; oma-2* aboutit à la formation d'une tumeur bénigne constituée de cellules différenciées (Narbonne *et al.*, 2017) (**Figure I-10B**).

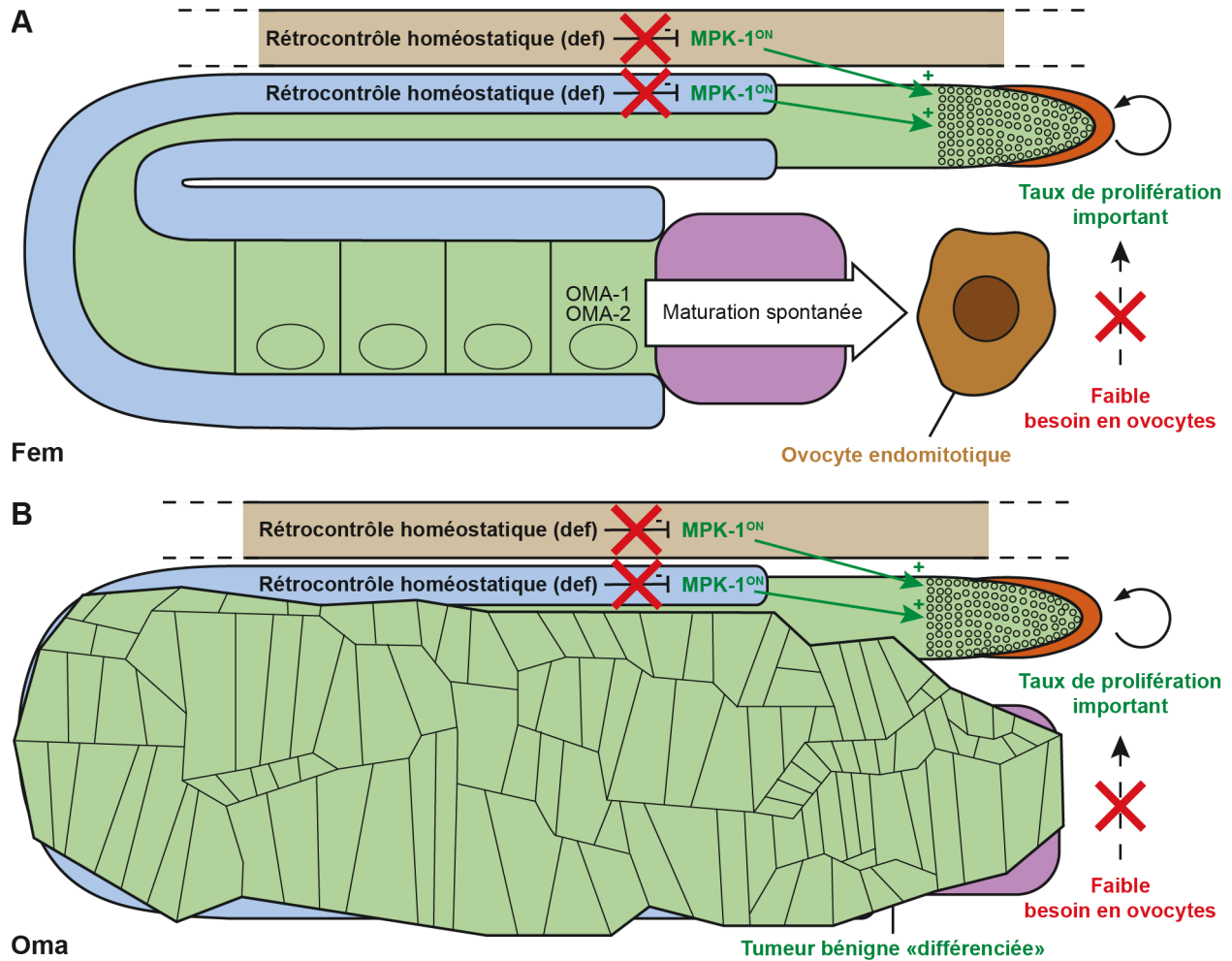


Figure I-10. Un rétrocontrôle homéostatique défectueux restaure un taux de prolifération élevé des cellules souches germinales chez les hermaphrodites Fem et Oma. (A-B) Schématisation d'une gonade antérieure. Les organes et leur code couleur sont similaires à la figure I-3B. Flèche verte, stimulation ; barre rouge, inhibition. Def, défectueux. Antérieur, à gauche ; dorsal, en haut. La perte de fonction d'un effecteur du rétrocontrôle homéostatique aboutit à la levée d'inhibition de MPK-1 dans l'intestin ou la gaine, ce qui est suffisant pour restaurer un fort taux de prolifération des CSG. **(A)** Dans un fond génétique féminisé (Fem), l'ovocyte le plus proximal subit une maturation spontanée, et rentre dans un cycle endomitotique. L'ovulation des ovocytes endomitotiques empêche leur accumulation dans la gonade proximale. **(B)** Dans un fond génétique où les ovocytes sont incompetents à la maturation (Oma), leur suraccumulation aboutit à la formation d'une tumeur bénigne. Ce phénotype permet d'identifier facilement de nouveaux gènes dont la perte de fonction cause un défaut de signalisation homéostatique (Narbonne *et al.*, 2017).

L'initiation de la cascade inhibitrice est corrélée avec l'accumulation d'ovocytes dans les vers âgés et dans les fonds génétiques féminisés et *oma-1*; *oma-2*, ce qui sous-entend qu'il existe un mécanisme capable d'intégrer la variation du nombre de cellules différenciées. Un signal est alors transmis à travers plusieurs tissus pour moduler la prolifération des CSG. DAF-18 est requise dans la spermathèque pour maintenir la contraction de la valve distale dans les individus féminisés (Deng *et al.*, 2025) et la fonction d'AAK-1 est nécessaire dans les cellules de la gaine gonadique

(Xavier Lechasseur, *en préparation*). Des travaux récents ont également montré que MPK-1/ERK doit être inhibée dans l'intestin et les cellules de la gaine pour réprimer la prolifération des CSG de manière cellulaire non-autonome (Robinson-Thiewes *et al.*, 2021) (Lloyd Venceslas Fotso Dzuna, *en préparation*) (**Figure I-11**).

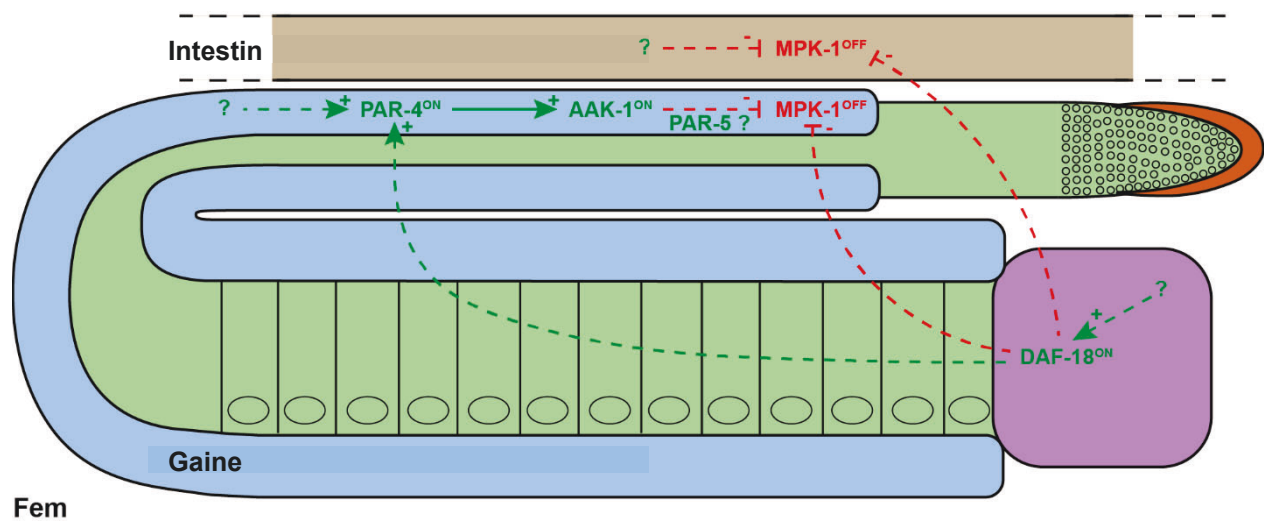


Figure I-11. Les bases moléculaires de la signalisation germinale homéostatique. Schématisation d'une gonade antérieure. Les organes et leur code couleur sont similaires à la figure I-3B. Flèche verte, stimulation ; barre rouge, inhibition. Pointillés, interactions directes ou indirectes hypothétiques. Antérieur, à gauche ; dorsal, en haut. Les études précédentes du laboratoire ont décrypté une partie du mécanisme homéostatique. En outre, MPK-1 est épistatique sur DAF-18 et AAK-1 (Narbonne *et al.*, 2017) (Xavier Lechasseur, *en préparation*) ; DAF-18 est requise dans la spermatheque pour maintenir la valve distale contractée et empêcher l'ovulation de l'ovocyte le plus proximal (Deng *et al.*, 2025) ; et AAK-1 est requise dans les cellules de la gaine gonadique (Xavier Lechasseur, *en préparation*). PAR-4 et PAR-5, dont les fonctions nécessitent des interactions physiques, devraient être requises dans le même tissu qu'AAK-1 – les cellules de la gaine. Néanmoins, les signaux qui permettent d'activer DAF-18 et PAR-4, ainsi que le signal responsable de l'inhibition de la MPK-1 intestinale, restent à identifier.

8. Hypothèse et objectifs du travail de recherche

Nous avons vu que *C. elegans* est un organisme modèle qui a de nombreux avantages tels que sa transparence, son cycle de vie court et son grand nombre de descendants. Il existe sous deux formes sexuelles, hermaphrodite et mâle. Le déterminisme sexuel est régulé par une cascade d'inhibitions qui met notamment en œuvre les gènes *fem* et *fog*, dont la perte de fonction aboutit à un phénotype féminisé. Dans les hermaphrodites, une phase de spermatogenèse transitoire est initiée au cours du stade larvaire L4, qui génère un nombre limité de spermatozoïdes, stockés dans les spermatheques. L'inhibition de l'expression du transcrit *fem-3* dans les jeunes adultes permet de basculer vers l'ovogenèse de manière irréversible. Nous avons vu que la gonade se développe

en plusieurs phases et qu'elle est polarisée de distal vers proximal par la CED, ce qui permet d'organiser spatialement la progression dans la prophase I de méiose dans la gonade. Nous avons également vu que les ovocytes les plus proximaux sont arrêtés au stade diakinèse, et que leur maturation nécessite la PMS, un signal provenant des spermatozoïdes. Les protéines OMA-1 et OMA-2 sont redondantes, et agissent de manière cellulaire autonome dans les ovocytes pour favoriser la maturation. La maturation et l'ovulation sont deux mécanismes dépendants de la gonade somatique, et notamment des cellules de la gaine gonadique. L'identité mitotique des CSG est maintenue par la voie Notch, dont le ligand est exprimé par la CED. Le taux de prolifération des CSG est favorisé par la SII, à l'échelle systémique. Lorsque la réserve de spermatozoïdes est épuisée, que l'individu est féminisé, ou que la maturation de l'ovocyte le plus proximal ne peut se produire, un rétrocontrôle homéostatique inhibe la signalisation MPK-1/ERK dans la gaine gonadique et l'intestin, ce qui aboutit à une mise en quiescence réversible des CSG. Certains effecteurs du rétrocontrôle homéostatique ont déjà été identifiés par notre laboratoire et fonctionnent de manière cellulaire non-autonome. Cependant, nous ne connaissons pas les signaux permettant de coordonner ces différents acteurs, et nous ne comprenons pas encore comment l'accumulation des ovocytes est perçue à l'échelle cellulaire et moléculaire.

Nous avons donc formulé l'hypothèse que **des régulateurs additionnels de la signalisation germinale homéostatique restaient à identifier.**

Nous avons utilisé une lignée de *C. elegans* hétérozygote *oma-1/nT1; oma-2/nT1*, dont la descendance homozygote *oma-1; oma-2* ne peut pas induire la maturation de l'ovocyte le plus proximal, ce qui aboutit à une accumulation d'ovocytes et au déclenchement du rétrocontrôle homéostatique (Narbonne *et al.*, 2017) (**voir section 7**). Ces individus ont également dans leur

génomique l'insertion simple-copie d'un transgène qui permet l'expression d'une protéine fluorescente verte en aval d'un promoteur spécifique à la lignée germinale (*cpSi42[Pmex-5::mNeonGreen]*). Étant donné que dans ce fond génétique, l'ovocyte le plus proximal ne peut pas subir de maturation spontanée, un défaut de signalisation homéostatique aboutit à la formation d'une tumeur bénigne constituée de cellules différenciées, facilement identifiable avec un microscope à fluorescence à faible grossissement (Narbonne *et al.*, 2017) (**voir section 7**).

Nous avons utilisé cette lignée pour mener une approche de mutagenèse aléatoire et avons isolé 9 mutants dont la signalisation germinale homéostatique est défectueuse (Ghd). Le génome complet de ces mutants a été séquencé. J'ai utilisé ces mutants ainsi que leurs données de séquençage dans le but de trouver de nouveaux gènes impliqués dans le rétrocontrôle homéostatique. Mon projet de recherche se divise en trois objectifs.

Objectif 1 : identifier les lésions moléculaires responsables de la perte du signal d'inhibition homéostatique de la prolifération des CSG.

- 1.1 Je vais comparer les données de séquençage du génome entier des mutants *ghd* avec le génome de référence en utilisant la plateforme Galaxy. Cela va me permettre d'identifier la position des mutations induites par le mutagène chimique, et donc les gènes affectés.
- 1.2 En utilisant la lignée initiale *oma-1/nTI*; *oma-2/nTI*, je vais effectuer un criblage par ARNi pour dépléter un gène candidat à la fois. Je vais me concentrer dans un premier temps sur les gènes mutés dans 2 (ou plus) des mutants *ghd*. La réduction de l'expression d'un candidat impliqué dans le RCH devrait être suffisant pour induire le phénotype Ghd dans la descendance *oma-1*; *oma-2*.
- 1.3 Je confirmerai que la perte de fonction génétique du gène identifié aboutit au même phénotype que sa réduction par ARNi. En outre, j'effectuerai des tests de complémentation en utilisant les

individus *ghd* issus de la mutagenèse pour confirmer que la mutation du gène identifié – parmi toutes les autres mutations – est bien la cause du phénotype Ghd.

Objectif 2 : identifier les partenaires du gène nouvellement impliqué dans la signalisation homéostatique.

- 2.1 J'effectuerai un second criblage par ARNi dans le fond génétique *oma-1; oma-2* en ciblant les interacteurs physiques et génétiques du gène identifié dans l'objectif 1. J'observerai si la réduction de leur expression est suffisante pour affecter la signalisation homéostatique et induire le phénotype Ghd.
- 2.2 Je réitérerai l'approche en ciblant des gènes connexes à ceux identifiés dans l'objectif 2.1, ce qui va me permettre de mettre en évidence un plus grand nombre d'acteurs impliqués dans la signalisation homéostatique.
- 2.3 Je confirmerai l'implication de ces partenaires en vérifiant si leur perte de fonction aboutit au phénotype Ghd dans le fond génétique *oma-1; oma-2* et/ou à un IM élevé dans le fond génétique *fog-1*.

Objectif 3 : Décrire le rôle spatial des gènes découverts et leur interaction avec les deux branches de régulation de la prolifération des CSG

- 3.1 J'utiliserai des rapporteurs fluorescents pour caractériser le patron d'expression des nouveaux effecteurs du RCH identifiés au cours des deux objectifs précédents.
- 3.2 Je me servirai des doubles mutants féminisés ayant un défaut de signalisation homéostatique générés dans l'objectif 2.3 pour conduire des expériences de sauvetage tissu-spécifique. Pour ce faire, je réintroduirai par transgénèse la copie sauvage du gène homéostatique déplété, en

aval d'un promoteur spécifique à un tissu d'intérêt. Je me focaliserai sur les tissus dans lequel j'aurai détecté l'expression de la protéine codée par le gène d'intérêt.

3.3 Je conduirai des tests épistatiques pour étudier l'interaction des nouveaux effecteurs avec les deux voies parallèles contrôlant la prolifération des CSG : la SII et le RCH.

Dans le **chapitre II**, j'utilise des ARNi et des tests de complémentation fonctionnelle pour montrer que TIR-1/SARM1 réprime la suraccumulation de cellules germinales différenciées dans le fond génétique *oma-1*, 2 (objectif 1). Au cours d'un second criblage ARNi, dirigé contre les partenaires de TIR-1, je mets en évidence un résultat similaire pour la pseudokinase NIPI-3/TRIB1, ainsi que pour les kinases du module p38 MAPK conservé NSY-1/MAP3K5, 6, 15 → SEK-1/MAP2K3, 6 → PMK-1/MAPK11 à 14, impliquées dans la réponse aux stress. En outre, je montre que NSY-1, SEK-1 et PMK-1 sont nécessaires pour favoriser la mise en quiescence des CSG dans un fond génétique féminisé (objectif 2). En utilisant des approches de sauvetage phénotypique et des tests d'épistasie, je mets en évidence que la signalisation *pmk-1/p38* est nécessaire dans les cellules de la gaine, en amont de l'inhibition homéostatique de MPK-1 (objectif 3).

Dans le **chapitre III**, j'investigue si le module conservé JNK MAPK, MLK-1/MAP3K9 à 11 → MEK-1/MAP2K7 → KGB-1, 2/MAPK10, 9, également impliqué dans la réponse aux stress, favorise la mise en quiescence homéostatique des CSG dans un fond génétique féminisé ou *oma-1*, 2. Mes résultats préliminaires indiquent que la réduction de *mlk-1*, *mek-1* ou *kgb-1*, 2 par ARNi aboutit à une suraccumulation de cellules germinales différenciées dans le fond génétique *oma-1*, 2. En outre, la perte de fonction génétique de *kgb-1*, 2 perturbe la mise en quiescence des CSG dans un fond génétique féminisé.

CHAPITRE II

Non-autonomous PMK-1/p38 MAPK signaling ensures homeostatic downregulation of germline stem cell proliferation in *C. elegans*

Authors

Alexandre Clouet, Matthieu Valet, Benjamin Dufour, Janina Rieger, Xavier Lechasseur, Aurelia Thérèse Condomat Zoumabo, Lloyd Venceslas Fotso Dzuna, Alexane Murray, Jichao Deng, Pier-Olivier Martel and Patrick Narbonne

Soumis

Affiliations

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

Groupe de Recherche en Signalisation Cellulaire, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC G8Z 4M3, Canada

Corresponding author's email address

patrick.narbonne@uqtr.ca

Author contributions

Conceptualization: AC, PN

Methodology: AC, MV, PN

Validation: AC

Formal Analysis: AC, MV

Investigation: AC (epifluorescence and confocal acquisitions; genetic crosses; whole genome sequencing data analysis; complementation tests; AAK-1 and TIR-1 conserved domain annotation; TIR-1 homologs alignment; RNAi design and construction; RNAi screening; pCLT1-3 design; pCLT13-14 design and construction; UTR295, 299, 570-571, 732-733 transgenic lines establishment; immuno and DAPI staining; EMO quantification, viable adult progeny quantification), MV (whole genome sequencing: pipeline design and data analysis; AAK-1 homologs alignment), BD (EMS mutagenesis; Ghd screening and mutant isolation), JR (pCLT1-3: construction; UTR377-379 transgenic lines establishment; image acquisition for Figure 2 and S3), XL (pXA1-9 design and construction), ATCZ (DAPI staining for Figures 3 and S2; image acquisition for Figure S4), LVFD (UTR621 genetic cross), AM (RNAi screening for Table S1), JD (Ghd screening), POM (Ghd screening), PN (EMS mutagenesis; Ghd screening and mutant isolation; whole genome sequencing library preparation, transgene microinjection)

Resources: PN

Writing – Original Draft: AC

Writing – Review and Editing: AC, PN

Funding acquisition: PN

Summary

Stem cell underproliferation leads to tissue loss while over proliferation favors hyperplasia and tumorigenesis. Stem and progenitor proliferation rates are therefore usually coupled to the needs for their differentiated cellular progenies in the tissue(s) they serve, yet these homeostatic mechanisms remain poorly understood. Here, we used the *C. elegans* hermaphrodite reproductive system to understand how germline stem cell (GSC) proliferation is linked to sperm availability and oocyte usage. We developed a forward genetic screening method to identify genes required for the homeostatic downregulation of GSC proliferation when oocytes are not used, where germline homeostasis defective (*ghd*) mutants grow benign differentiated germline tumors. We provide evidence that the TIR-1/SARM1 metabolic sensor works together with the NIP1-3/TRIB1 pseudokinase to activate a canonical PMK-1/p38 MAPK signaling cascade in the somatic gonad, shut down the oncogenic extracellular signal regulated kinase MPK-1/ERK, to cell non-autonomously couple GSC proliferation to oocyte needs. Similar multi-tissue signaling modules could underlie homeostatic stem cell regulation and prevent benign tumorigenesis in other systems, including humans.

Keywords

C. elegans, germline stem cell, homeostatic regulation, MPK-1/ERK, NIP1-3/TRIB1, PMK-1/p38 MAPK, proliferation, stress, TIR-1/SARM1, tumor suppressor

Introduction

Stem cells (SCs) are essential throughout the life of organisms. They are required to generate functional tissues and organs during development and to ensure a healthy cellular turnover during adulthood. However, as each of their division comes with the risk of introducing replication and segregation errors, such that an increased number of SC divisions predisposes to cancer (Tomasetti *et al.*, 2017; Tomasetti & Vogelstein, 2015), SC proliferation rates must be tightly regulated to prevent any unnecessary division.

SC proliferation may be influenced by systemic elements, such as hormones and growth factors. Notably, nutrient uptake sustains SC proliferation through activating the conserved insulin/insulin-like growth factor 1 signaling (IIS) pathway (Shim *et al.*, 2013). Tissue-specific homeostatic regulatory mechanisms can further link stem/progenitor cell proliferation to various cues, including a tissue's need for their differentiated cellular progeny. For instance, abundant differentiated progeny sends a paracrine signal through FGF18 and BMP6 to promote bulge SC quiescence in murine hair follicles (Hsu *et al.*, 2011). Negative feedback loops required for downregulation of immature cell proliferation were also found in invertebrates. In *Drosophila* larvae, a multi-tissue signal is initiated by the hematopoietic progenitor niche and integrated by differentiated hemocytes, resulting in adenosine deaminase Adgf-A secretion to inhibit the extracellular mitogenic function of adenosine by converting it into inosine (Mondal *et al.*, 2011). Furthermore, in the adult midgut, damaged, infected or stressed enterocytes secrete cytokines that promote intestinal SC proliferation through the Jak/Stat pathway (Jiang *et al.*, 2009).

Another example has been observed in *C. elegans* hermaphrodites. During the last larval stage, a limited number of spermatozoa are generated and stored in spermathecae (Hubbard & Greenstein, 2005). In adults, the germline stem cell (GSC) differentiation program irreversibly

switches to oocyte production, which are continually fertilized until spermathecae are emptied. When this happens, oocytes accumulate in proximal gonad arms, and homeostatic feedback represses GSC proliferation to prevent oocyte overaccumulation (Cinquin *et al.*, 2016; Narbonne *et al.*, 2015, 2017). Germline feminizing mutations (*i.e.* *fog* and *fem* mutants) (Barton & Kimble, 1990; Kimble *et al.*, 1984) that prevent sperm formation trigger homeostatic downregulation of GSC proliferation in young adults, while this process can be reversed upon mating with a male (Narbonne *et al.*, 2015). Downregulation of GSC proliferation is also irreversibly triggered in oocyte maturation defective *oma-1/2* mutants in which sperm is present, but oocytes are activation incompetent (Detwiler *et al.*, 2001; Narbonne *et al.*, 2017). Since arrested oocytes are not laid in this background, it creates a valuable paradigm to study the formation of benign differentiated tumors as oocytes keep accumulating in *oma-1/2* mutants that are further defective in GSC homeostasis regulation (Narbonne *et al.*, 2015, 2017; Valet & Narbonne, 2022).

A gain-of-function (*gf*) allele in the *C. elegans* Rat sarcoma (Ras) ortholog *let-60* prevents the homeostatic downregulation of GSC proliferation (Narbonne *et al.*, 2017), while LET-60 is a key activator of the extracellular regulated kinase (ERK) ortholog MPK-1 (Church *et al.*, 1995; Lackner *et al.*, 1994), an important positive regulator of GSC proliferation (Lee *et al.*, 2007; Narbonne *et al.*, 2017). Interestingly, MPK-1 promotes GSC proliferation cell non-autonomously as transgenic rescue of the soma-specific MPK-1A isoform restores GSC proliferation in *mpk-1(Ø)* mutants (Robinson-Thiewes *et al.*, 2021). Therefore, somatic MPK-1 may be inhibited by homeostatic signaling to induce GSC quiescence.

Several factors are required for homeostatic downregulation of GSC proliferation. These include the *C. elegans* orthologs of the liver kinase B1 (LKB1), the AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ catalytic subunit (PRKAA2), the phosphatase and tensin homolog (PTEN), and 14-3-3: PAR-

4, AAK-1, DAF-18 and PAR-5, respectively. Depletion of any of these gene products disrupt germline homeostasis and prevents the downregulation of GSC proliferation in the absence of sperm (Narbonne *et al.*, 2017). In these spermless homeostasis-defective double mutants, GSC proliferation and oocyte production proceed at a fast pace, as in the wild-type, while oocytes spontaneously mature, are ovulated and laid as endomitotic oocytes. Apart from an epistasis analysis that placed *daf-18* upstream of *mpk-1* inhibition (Narbonne *et al.*, 2017) and the direct phosphorylation link between PAR-4/LKB1 and AAK-1/AMPK (Narbonne & Roy, 2006; Woods *et al.*, 2003), how the components of this cryptic cascade assemble to link oocyte needs to MPK-1 activity in somatic tissues remains unclear. The identification of new germline homeostasis effectors along with their spatial requirements and targets would represent a significant step towards decrypting this mechanism.

Here, we present a forward genetic screen designed to identify new germline homeostasis defective (*ghd*) mutants. This screen highlighted a new tumor suppressor role for the *C. elegans* ortholog of Sterile Alpha and TIR motif containing 1 (SARM1) TIR-1. This led us to implicate a conserved p38 MAPK signaling module in the regulation of GSC homeostasis. We propose a model in which accumulating oocytes in the proximal somatic gonad initiate a PMK-1/p38-dependent stress-like response leading to the downregulation of somatic MPK-1/ERK activity and hence, of GSC proliferation.

Results

A forward genetic screen to identify germline homeostasis-defective mutants

To identify new genes required for homeostatic repression of GSC proliferation, we designed a new forward genetic screen. We used ethyl methanesulfonate (EMS) (Brenner, 1974) to

mutagenize *oma-1/+; oma-2/+* L4 larvae and screened their *oma-1/2* F2 progeny for mutations that would cause the formation of benign differentiated germline tumors, likely owing to a disruption in GSC homeostasis regulation (Figure 1A) (Narbonne *et al.*, 2017). Mutagenized animals carried a transgene that labelled their germ membranes with green fluorescence (Shaner *et al.*, 2013) to facilitate tumor detection under a low-magnification fluorescence microscope (Figure 1A). Over two small-scale screens covering approximately 8000 haploid genomes, we isolated 9 independent *ghd* candidates. Whole genome sequencing of these candidates revealed that 26 genes were affected by at least two independent mutations.

One of the genes mutated in three of the *ghd* candidates was *aak-1*, essential for homeostatic downregulation of GSC proliferation (Figure 1B-H) (Narbonne *et al.*, 2017). Consistent with *aak-1* mutations being responsible for the Ghd phenotype of these three candidates, they failed to complement each other (Figures 1I-N). Furthermore, transgenic somatic expression of *aak-1(+)* suppressed tumors in both *ghd-1(nar5)* and *ghd-1(nar38)* (Figures 1O-P; rescue of *ghd-1(nar4)* was not attempted due to a second-site mutation in *tir-1* as detailed below), confirming that *ghd-1* corresponded to *aak-1*. Importantly, identification of three independent *aak-1* alleles established the screen's efficiency at isolating *ghd* mutants.

TIR-1/SARM1 prevents the formation of differentiated germline tumors

Since genes with multiple hits in our screen were more likely to represent genuine *ghd* candidates, we fed *oma-1/2* double homozygotes with RNAi clones targeting each of them, looking for one that caused a Ghd phenotype. We found that RNAi against *tir-1*/SARM1, led to differentiated germline tumor formation in the *oma-1/2* background, and thus phenocopied the two *ghd* candidates that carried a *tir-1* mutation (Figure 2A-E, Table S1). To confirm that *tir-1* was required to prevent tumorigenesis, we examined two available predicted null *tir-1* deletion alleles:

tir-1(ok2859) and *tir-1(qd4)* (Shivers *et al.*, 2009) in the *oma-1/2* background. As expected, both deletions induced differentiated tumorigenesis in this background (Figure 2F-G). Moreover, neither *ghd-2(nar42)* nor *ghd-2(nar65)* complemented *tir-1(ok2859)*, suggesting that *ghd-2* corresponds to *tir-1* (Figure 2H-L).

TIR-1/SARM1 is an adaptor protein and metabolic sensor (Figley *et al.*, 2021) implicated in innate immune response (Couillault *et al.*, 2004; Liberati *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2022; Tse-Kang *et al.*, 2024), nervous system development (Chuang & Bargmann, 2005), and neurodegeneration (both ALS-induced and Wallerian) (Czech *et al.*, 2023; Gerdts *et al.*, 2015; Osterloh *et al.*, 2012; Veriepe *et al.*, 2015). It is composed of autoinhibitory armadillo repeats, two Sterile Alpha Motif (SAM) domains, and a Toll/Interleukin-1 receptor/Resistance protein (TIR) domain (Liberati *et al.*, 2004; Mink *et al.*, 2001), with the latter two mediating protein-protein interactions with other SAM or TIR domain-containing proteins (Stapleton *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000). The TIR domain also confers NAD⁺ hydrolase activity to TIR-1, required for Wallerian degeneration (Essuman *et al.*, 2017; Gerdts *et al.*, 2015). Interestingly, our two *tir-1* alleles had conserved residues substituted in the SAM1 (*nar65[L708F]*) or TIR (*nar42[A846T]*) coding sequences (Figure 2M-O), suggesting that both domains are required for tumor suppression.

Canonical *pmk-1*/p38 MAPK signaling is required for homeostatic inhibition of GSC proliferation

To investigate how TIR-1 may prevent tumorigenesis in the *oma-1/2* background, we performed a second RNAi screen targeting known *tir-1* interactors. Interestingly, knockdown of *pmk-1*, the ortholog of p38 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 11 to 14, induced a fully penetrant Ghd phenotype (Figure 3A-B; Table S2). PMK-1/p38 is therefore, like TIR-1/SARM1, required to suppress oocyte production when their final maturation is blocked. As in mammals,

PMK-1/p38 activation in *C. elegans* follows a canonical NSY-1/mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5/6/15 (MAP3K5/6/15) and SEK-1/mitogen-activated protein kinase kinase 3/6 (MAP2K3/6) phosphorylation cascade (Ichijo *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2002). Previous studies have also demonstrated that TIR-1 functions upstream of *pmk-1*/p38 signaling in the *C. elegans* innate immune response (Liberati *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2022; Tse-Kang *et al.*, 2024) and neurodegeneration (Czech *et al.*, 2023; Veriepe *et al.*, 2015). We therefore investigated if *nsy-1* and *sek-1* were also required for germline homeostasis. We found that *nsy-1(RNAi)* and *sek-1* loss-of-function each led to differentiated germline tumors in the *oma-1/2* background (Figure 3C-D, Table S2), suggesting that TIR-1 may work through canonical *pmk-1*/p38 signaling to prevent their formation.

To confirm that *pmk-1*/p38 signaling is required for homeostatic downregulation of GSC proliferation, we crossed *nsy-1*, *sek-1*, and *pmk-1* loss-of-function alleles in a feminized *fog-1* background. As within *oma-1/2* double mutants, these animals accumulate oocytes before GSC proliferation and differentiation are inhibited (Lopez *et al.*, 2013; Narbonne *et al.*, 2015). All three mutations prevented the repression of GSC proliferation downregulation in the *fog-1* background, resulting in normal adult mitotic indexes (MIs) (Figure 3E-L). Interestingly, unlike *fog-1; aak-1* or *fog-1; daf-18* doubles, but similar to *fog-1; let-60(gf)* doubles (Narbonne *et al.*, 2017), *fog-1; nsy-1* and *fog-1; pmk-1* feminized doubles accumulated diakinesis oocytes, whereas *fog-1; sek-1* was intermediate (Figures 3M-O, S1A-E). Yet, the *fog-1; pmk-1* double mutants laid significantly more unfertilized oocytes compared to *fog-1* singles, paralleling *fog-1; aak-1* homeostasis-defective doubles, and consistent with their ongoing GSC proliferation and differentiation (Figure 3P). These results indicate that, unlike *aak-1* or *daf-18*, which also impact on ovulation control, defects in *pmk-1*/p38 signaling may more specifically prevent homeostatic repression of GSC proliferation, like *let-60(gf)*. We however note that *sek-1* may be more pleiotropic.

Consistent with its incompletely penetrant Ghd phenotype, and despite an upward trend in the GSC MI, *tir-1* loss-of-function did not significantly disrupt homeostatic induction of GSC quiescence in neither a feminized, nor an *oma-1/2* background (Figure S2A-B). Like *pmk-1*/p38 signaling mutants, the loss of *tir-1* did not prevent diakinesis oocyte accumulation (Figure S2C). These results support a role for *tir-1* upstream of *pmk-1*/p38 signaling in GSC homeostasis regulation, but its partial requirement imply the existence of additional upstream factors.

As the *C. elegans* ortholog of Tribbles homolog 1 (TRIB1) *nipi-3* was reported to activate *pmk-1*/p38 signaling in innate immunity (Pujol *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2021), we asked if it was required for germline homeostasis. Consistent with this, a conditional loss-of-function allele of *nipi-3* led to a fully penetrant Ghd phenotype in the *oma-1; oma-2* background under semi-permissive conditions (Figure 3Q-R). Even under restrictive conditions however, this allele did not impair feminization-induced downregulation of GSC proliferation (Figures S2A), although feminized *nipi-3* doubles showed intermediate diakinesis oocyte accumulation (Figure S2C). As they had similar partial roles, we tested the interaction between *tir-1* and *nipi-3*. In feminized hermaphrodites, the simultaneous loss of these factors did not perturb diakinesis-stage oocyte accumulation, nor homeostatic downregulation of GSC proliferation (Figure S2A, C). The absence of any additive or synergistic effects between *tir-1* and *nipi-3* favors the possibility that they contribute to *pmk-1*/p38 signaling activation sequentially. Altogether, our findings indicate that homeostatic repression of GSC proliferation depends on canonical *pmk-1*/p38 signaling, while NIPI-3/TRIB1 and TIR-1/SARM1 may jointly contribute to its activation.

PMK-1/p38 signaling inhibits gonadal sheath MPK-1 to induce GSC quiescence

Next, we asked in which tissue *pmk-1*/p38 signaling acts to promote GSC quiescence in feminized hermaphrodites. An endogenous tagged *pmk-1::GFP* allele was reportedly expressed in

the neurons, intestine, hypodermis and vulva precursor cells, but not in the germline (Shin *et al.*, 2018). Using this allele, we detected additional and relatively strong expression in the gonadal sheath nuclei, as well as in the spermathecae (Figure 4A), while feminization did not perturb this pattern (Figure 4B). We too failed to detect any PMK-1::GFP in the germline (Figure S3A-D).

We also tagged endogenous TIR-1 with mNeonGreen (mNG) at its C-terminus to mark all 8 isoforms. Consistent with the literature, we observed strong intestinal and neuronal *tir-1::mNG* expression (Czech *et al.*, 2023; Peterson *et al.*, 2022) (Figure S3E-F). As for PMK-1::GFP, we additionally detected TIR-1::mNG in the somatic gonad, but no germline expression (Figure S3E'-F'). The *tir-1::mNG* expression pattern was again, unaffected by feminization (Figure S3G-H'). The tag did not disrupt TIR-1's function as tagged animals generated a normal number of viable adults, unlike *tir-1(Ø)* (Figure S3I) (Shivers *et al.*, 2009). Based on the apparent absence of TIR-1 and PMK-1 from the germline, we reasoned that *pmk-1/p38* signaling must regulate GSC proliferation cell non-autonomously from within any somatic tissues where its components are present.

To identify this critical somatic tissue, we used extrachromosomal array transgenes (Mello *et al.*, 1991) to drive the expression of a wild-type *sek-1* copy downstream of various tissue-specific promoters in *fog-1; sek-1* doubles, and asked whether any would rescue homeostatic downregulation of GSC proliferation. We tested *sek-1* re-expression in the nervous system (*Punc-119*), intestine (*Pges-1*), gonadal sheath (*Plim-7*) and spermatheca/uterus (*Pfos-1*) (Hiatt *et al.*, 2009; Kennedy *et al.*, 1993; Maduro & Pilgrim, 1995; Sherwood *et al.*, 2005; Shivers *et al.*, 2009; Voutev *et al.*, 2009) (Figure 4C-D). Gonadal sheath-specific *sek-1(+)* expression restored GSC quiescence in *fog-1; sek-1* doubles, while expression in the nervous system, intestine or spermatheca/uterus did not (Figure 4E). Together, these results show that *sek-1*, and more broadly

pmk-1/p38 signaling, are required in the gonadal sheath to non-autonomously ensure germline homeostasis.

We next conducted epistasis analyses to find out how *pmk-1*/p38 signaling intersects with the two pathways stimulating GSC proliferation in *C. elegans*, IIS and homeostatic signaling (Narbonne *et al.*, 2017). Since the downregulation of IIS during early larval development promotes dauer formation (Kimura *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1996; Paradis *et al.*, 1999; Paradis & Ruvkun, 1998) while, to our knowledge, none of the *pmk-1*/p38 signaling component have been implicated in this developmental decision, we excluded the possibility of a role for *pmk-1*/p38 upstream of IIS. To evaluate a possible downstream role, we combined a *sek-1* loss-of-function allele with a *daf-2* conditional loss-of-function that significantly reduces the GSC MI under restrictive conditions (Narbonne *et al.*, 2015). The loss of *sek-1* however failed to restore GSC proliferation in *daf-2* mutants (Figure 4F). This result indicates that *sek-1*, and most likely that *pmk-1*/p38 signaling, is not required to suppress GSC proliferation downstream of IIS downregulation.

Since homeostatic downregulation of GSC proliferation requires the inhibition of MPK-1/ERK signaling (Narbonne *et al.*, 2017), we further examined the interaction of *pmk-1*/p38 signaling components with *mpk-1*. We crossed both a *sek-1* loss-of-function and a predicted null *nsy-1* allele in a *mpk-1*($\emptyset$) background. As both resulting double mutants had a low GSC MI, like *mpk-1*($\emptyset$) singles (Figure 4G, S2D), we infer that *pmk-1*/p38 signaling likely acts upstream of *mpk-1* to downregulate GSC proliferation. These results are consistent with a model in which the lack of sperm and/or oocyte accumulation would, partially through TIR-1/SARM1 and NIPI-3/TRIB1, activate canonical *pmk-1*/p38 signaling in the animal's gonadal sheath cells, from where this would in turn, inhibit MPK-1/ERK to cell non-autonomously promote GSC quiescence.

The p38 MAPK pathway is usually activated in response to various stresses, including pathogen exposure (Kim *et al.*, 2002), oxidative (Inoue *et al.*, 2005), heavy metal (Wang *et al.*,

2008) or mechanical stresses (Aikawa *et al.*, 2002; Gruden *et al.*, 2000; Hoffman *et al.*, 2017; Kook *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2002; Lal *et al.*, 2007; Liang & Gardner, 1999; Wernig *et al.*, 2003; Zhan *et al.*, 2007). We observed that oocyte accumulation was correlated with an increased proximal gonad length in feminized animals (Figure S4A-C). Oocyte accumulation therefore mechanically stretches the proximal sheath cells. We suggest that this mechanical stretching of the gonadal sheath cells could act as an upstream stress-like signal activating *pmk-1*/p38 signaling, in turn leading to the inhibition of MPK-1/ERK and GSC proliferation (Figure 4H).

Discussion

Several studies have investigated the role of p38 MAPK signaling on stem, progenitor, and cancer cell proliferation, but disagreed on whether it has an oncogenic or tumor-suppressive activity (Clouet & Narbonne, 2023; Martinez-Limon *et al.*, 2020). Our work reveals a clear tumor-suppressive role for *pmk-1*/p38 signaling in *C. elegans*, where it prevents GSC proliferation and differentiated germline tumor formation when sperm is absent, or oocytes are fertilization-incompetent. We showed that *pmk-1*/p38 signaling acts cell non-autonomously from the somatic gonadal sheath to promote GSC quiescence. The p38 MAPK was similarly reported to regulate SC proliferation cell non-autonomously in murine hair follicles. During the telogen phase, Caspase-3 cleaves Dusp8, a p38 MAPK inhibitor, thereby triggering a Wnt3-dependent signal that stimulates neighboring SC proliferation (Ankawa *et al.*, 2021). This conserved pathway may thus indeed have oncogenic or tumor-suppressive roles depending on context.

Few studies have explored a possible role for TIR-1/SARM1 in the regulation of cell proliferation or cancer biology. Nonetheless, SARM1 was among the most frequently mutated genes in peripheral blood samples from 60 patients with malignant ovarian germ cell tumors (Chen

et al., 2021). Additionally, SARM1 was overexpressed in three cervical cancer cell lines when compared to normal keratinocytes (Morale *et al.*, 2018) and its knockdown in HeLa cells led to decreased survival and increased chemosensitivity (Morale *et al.*, 2022). Furthermore, SARM1 physically interacts with the capsaicin receptor TRPV1 to prevent inflammatory cytokines production and maintain hepatic stellate cell quiescence (Tao *et al.*, 2023). Our results extend this tumor suppressive role for TIR-1/SARM1, likely through its well-characterized *pmk-1*/p38 signaling activating function (Liberati *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2022).

Although we initially identified *tir-1* through our screen, the core *pmk-1*/p38 signaling components downstream (*nsy-1*, *sek-1* and *pmk-1*) exhibited stronger defects. Their loss was indeed sufficient to restore high GSC MI in feminized animals and caused a fully penetrant, severe Ghd phenotype in the *oma-1/2* background. In contrast, TIR-1 loss resulted in an incompletely penetrant Ghd phenotype in this background and did not prevent downregulation of GSC proliferation. These results are consistent with previous studies reporting that PMK-1's activating phosphorylation is reduced in a *tir-1* loss-of-function context but is completely abolished by the loss of *nsy-1* function (Liberati *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2022; Tse-Kang *et al.*, 2024). TIR-1 thus likely cooperates with other factors to activate *pmk-1*/p38 signaling and homeostatic inhibition of GSC proliferation.

Based on its involvement as a *pmk-1*/p38 activator in the context of the innate immune response (Pujol *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2021), we asked if *nipi-3* was implicated in GSC homeostasis. The reduction of *nipi-3* function caused a slightly more severe Ghd tumorous phenotype than the loss of *tir-1*, while their combined loss was not additive. Conflicting models placed *nipi-3* either upstream of *pmk-1* activation in both *tir-1*-dependent (Pujol *et al.*, 2008) and -independent (Malinow *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2021) pathways, as a negative regulator of *pmk-1* (Kim *et al.*, 2016), or suggested that *nipi-3* functions independently of *pmk-1* (McEwan *et al.*, 2016). Our results suggest that *tir-1* and *nipi-3* both act in the same pathway and are responsible

for part of the core *pmk-1*/p38 signaling module activation towards homeostatic downregulation of GSC proliferation.

In adult *C. elegans* hermaphrodites, MPK-1/ERK and IIS promote GSC proliferation in parallel (Narbonne *et al.*, 2015). Based on the absence of dauer formation defects in *pmk-1* signaling mutants and our epistasis analysis, we concluded that IIS regulates GSC proliferation independently of *pmk-1*/p38 signaling. Our results showed that canonical *pmk-1*/p38 signaling regulate GSC proliferation upstream of MPK-1/ERK activity, while in the in the context of germline homeostasis, it was required in the gonadal sheath. As MPK-1/ERK can promote GSC proliferation either from the intestine or somatic gonad (Robinson-Thiewes *et al.*, 2021), the latter of which is largely composed of the sheath, we infer that *pmk-1*/p38 signaling links GSC proliferation to oocyte needs by cell-autonomously repressing *mpk-1* activity in the gonadal sheath, thereby limiting its ability to non-autonomously promote GSC proliferation from there (Figure 4H).

A cell-autonomous inhibitory role for p38 on ERK's oncogenic activity appears conserved. In a chicken allantoic membrane model, inhibition of p38, either pharmacologically or through a dominant negative allele, led to increased ERK activating phosphorylation in D-HEp3 cells, and interrupted their dormancy (Aguirre-Ghiso *et al.*, 2001). Similarly, in HT1080 fibrosarcoma and PC3 cell lines, the phospho-p38 to phospho-ERK ratio inversely correlated with proliferation, while shifting this balance was sufficient to favor growth or dormancy (Aguirre-Ghiso *et al.*, 2003). The precise mechanism by which p38 inhibits ERK signaling however remains unclear.

Exactly how *pmk-1*/p38 signaling gets activated in the context of GSC homeostasis remain to be elucidated. In mammals, p38 activation has been widely observed in response to mechanical stretching both in muscular (Kook *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2002; Lal *et al.*, 2007; Liang & Gardner, 1999; Wernig *et al.*, 2003; Zhan *et al.*, 2007) and stromal cells (Gruden *et al.*, 2000; Hoffman *et al.*, 2017). This mechanosensitive activation appears at least conserved throughout

vertebrates, as rainbow trout cardiac fibroblasts also activate p38 upon mechanical stretch (Johnston & Gillis, 2020). Based on this, we propose that in feminized *C. elegans*, the accumulation of large, differentiated oocytes may stretch the gonadal sheath cells that enwrap them, effectively mechanically stressing them, resulting in the activation of PMK-1 signaling specifically in this tissue.

A recent *C. elegans* study demonstrated that intestinal PMK-1 is required for the apoptotic elimination of germ cells with DNA damage, thereby preventing heritable aneuploidy (Soltanmohammadi *et al.*, 2022). Our findings therefore present a second non-autonomous role for somatic PMK-1/p38 signaling on the germline. More broadly, we expect p38 activation, whether triggered by an innate immune response or other stresses, to negatively regulate SC proliferation in many other contexts. If the molecular mechanisms we described here in *C. elegans* are evolutionary conserved, we would speculate that stresses that activate p38 signaling, like contracting an infection for example, may have negative consequences on the proliferation of certain SC populations. A shift from growth to defense could indeed represent an adaptive strategy to prioritize defense/survival over growth/reproduction.

Acknowledgments

We thank Monique Zetka for reagents. Some strains were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). We are grateful to the *C. elegans* gene knockout consortium and to WormBase for their essential roles in *C. elegans* research. Research in the Narbonne laboratory is funded by grants from the NSERC (RGPIN-2019-06863, RGPAS-2019-00017, DGEER-2019-00326), the CIHR

(PJT-169138), and a Research Chair from the *Fondation Marcel et Rolande Gosselin* to PN. PN is a junior 2 FRQS bursary scholar (310643).

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

Material and methods

Key resources table

Reagent or Resource	Source	Identifier
Antibodies		
Mouse anti-pH3 (monoclonal)	Cell Signaling	Cat# 9706; RRID:AB_331748
Rabbit anti-WAPL-1 (polyclonal)	Novus Biologicals	Cat# 49300002; RRID:AB_10718903
Rabbit anti-HIM-3 (polyclonal)	Dr Monique Zetka	N/A
A488-conjugated goat anti-mouse (monoclonal)	Invitrogen	Cat# A-11029; RRID:AB138404
A546-conjugated goat anti-rabbit (monoclonal)	Invitrogen	Cat# A-11035; RRID:AB143051
Chemicals and enzymes		
Carbenicillin, disodium salt	Bioshop	CAR666.5
Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Bioshop	IPT002.50
Ethyl methanesulfonate (EMS)	Sigma-Aldrich	M0880
Duolink <i>in situ</i> mounting medium with DAPI	Sigma-Aldrich	DUO82040
Hygromycin B, sterile liquid in PBS	Bioshop	HYG002

Tetramisole hydrochloride	Sigma-Aldrich	L9756
Organisms/strains		
<i>C. elegans</i> strains	See table S3	N/A
<i>Escherichia coli</i> : OP50	CGC	N/A
<i>Escherichia coli</i> : HT115	CGC	N/A
Oligonucleotides		
Oligonucleotides	See Table S4	N/A
Softwares		
Graphpad Prism 8.0.2	graphpad.com	N/A
Zeiss Zen 2.6	zeiss.com	N/A
ImageJ	imagej.net	N/A
Leica LAS AF 4.0.0.11706	leica-microsystems.com	N/A
Snapgene 5.0.8	snappgene.com	N/A

Experimental model

C. elegans strains and maintenance

C. elegans were maintained according to standard procedures on Nematode Growth Media (NGM) plates seeded with *Escherichia coli* (OP50) at 15°C unless otherwise indicated. The Bristol isolate (N2) was used as the wild-type (Brenner, 1974). Table S4 lists all alleles, transgenes and rearrangements used in this study.

Method details

Synchronization

Gravid adults were harvested in Milli-Q water and vortexed in a 250 mM NaOH, 1% bleach solution for approximatively 5 minutes. After 3 milli-Q water rinses, eggs were resuspended in M9

buffer and allowed to hatch for 24 hours in the absence of food under gentle agitation at 15°C. The resulting synchronized L1s were then plated on standard seeded NGM plates at 15°C unless otherwise indicated.

EMS mutagenesis

Synchronized *oma-1/nT1; oma-2/nT1* heteterozygous P0 late L4 larvae (complete genotype: *cpSi42[Pmex-5::mNG::PLCδ-PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)]II; oma-1(zu405te33)/nT1 [qls51] IV; oma-2(te51)/nT1 V*) were incubated for 4h in M9 containing 50 mM EMS (Brenner, 1974), rinsed and replated for an additional 24 hours. F1 L1s were then recovered by bleach-synchronization and plated at 15°C until they reached the L4 stage. Heterozygous *oma-1/nT1; oma-2/nT1* L4 F1s were manually transferred to new plates (5/plate) and allowed to produce F2 progeny. Once the oldest F2s had reached the L4 stage, plates were upshifted to 25°C to permit the recovery of eventual temperature sensitive alleles. Approximately 8000 haploid genomes were screened over two separate screens, and 9 independent *oma-1/nT1; oma-2/nT1* heterozygous F1s that segregated Ghd *oma-1; oma-2* animals were identified. The *oma-1/nT1; oma-2/nT1* heterozygous siblings from Ghd candidates were singled to new plates, back at 15C, to recover *oma-1/nT1; oma-2/nT1; ghd(-/-)* animals. Once homozygous, candidate mutant populations were expanded and subjected to whole-genome sequencing.

Whole genome sequencing and data analysis

Libraries were prepared from gDNA and sequenced by Genome Québec (Montréal, Canada) using a paired-end Illumina NovaSeq PE150. Sequencing depth varied between 40.25 M – 59.55 M (mean: 52.55 M) reads per samples.

The raw read sequences were mapped to the N2_cell1 reference genome using Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012; Langmead *et al.*, 2009), and processed through a variant calling and filtering pipeline, composed of MiModD (Maier *et al.*, 2014), SnpEff (Cingolani *et al.*, 2012b) and SpSift Filter (Cingolani *et al.*, 2012a) on the Galaxy platform (Community, 2024). Candidate *ghd* mutations were homozygous WT (+/+) in the initial strain and homozygous mutant (-/-) in the *ghd* candidates. Since candidates carried the nT1 reciprocal translocation to balance *oma-1* and *oma-2*, we also considered the variants that were heterozygous (+/-) within the nT1-balanced region (ChrIV 3,618,259-17,493,829; ChrV 1-15,080,152) in the *ghd* mutants. The *ghd-1* (*aak-1*) and *ghd-2* (*tir-1*) mutations were subsequently confirmed using Sanger sequencing.

Viable adult progeny quantification

Late L4-stage larvae were singled at 25°C and transferred every 24h to a new plate until individuals laid no eggs over the next 24h or ruptured due to an Egl phenotype. The number of viable adult progeny was scored.

GSC MI quantification

GSC MIs were evaluated as previously described (Narbonne *et al.*, 2015). As we used a temperature-sensitive *fog-1(q253)* allele, P0s were upshifted from 15°C to 25°C to prevent sperm formation in their F1 progeny. Late L4-staged F1 progeny were identified based on vulva development (Seydoux *et al.*, 1993) and picked to a new plate at 25°C, allowing them to grow for an additional 24 hours. Resulting adult day-1 (A1) animals were then harvested, and their gonads were dissected as described (Narbonne *et al.*, 2017) in a drop of PBS on a coverslip, which was then flipped against a poly-L-lysine coated slide and submitted to a freeze-crack procedure. This manipulation was always accomplished within 5 minutes (Lee *et al.*, 2007).

Gonads were fixed in -20°C methanol for 1 minute followed by a postfixation in 3.7% paraformaldehyde PBST (1x PBS + 0.1% Tween 20) for 30 minutes. After 1 PBST rinse and 3 10-minutes PBST washes, samples were blocked for 1 hour at room temperature in PBST containing 3% bovine serum albumin (BSA). After the blocking solution was removed, samples were incubated overnight at 4°C in primary antibody solution diluted in PBST containing 1% BSA. Anti-WAPL-1 (Crawley *et al.*, 2016; Kocsisova *et al.*, 2018) or anti-HIM-3 (Zetka *et al.*, 1999) antibodies (1:500 each) were used to identify PZ cells (either WAPL-1 positive or HIM-3 negative), and anti-phospho[S10]-histone H3 were used to label M-phase nuclei (Sauve *et al.*, 1999) (1:250). After 1 PBST rinse and 3 10-minute PBST washes, gonads were incubated in the dark for 90 minutes at room temperature in goat-anti-rabbit alexa546 (1:500) and goat-anti-mouse alexa488 (1:500) secondary antibody solution diluted in PBST containing 1% BSA. After 1 PBST rinse and 2 10-minute PBST washes, samples were incubated for 7 more minutes in 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1µg/ml in PBS). After a final PBST rinse and a 10-minute PBST wash, gonads were mounted in 8µl Duolink *in situ* mounting medium, sealed with nail polish, and stored at -20°C until imaged. Undifferentiated germ nuclei counting in 3 dimensions was partially automated as described (Korta *et al.*, 2012), using an ImageJ plugin developed by Dr Jane Hubbard's laboratory.

For *daf-2(e1370)* mutants (Gottlieb & Ruvkun, 1994) (Figure 4F), animals were grown at 15°C until the late L4-stage to prevent dauer formation, before they were picked to a new plate and upshifted to 25°C for an additional 24h. Resulting A1 hermaphrodites were dissected, stained, imaged and analyzed as above.

Diakinesis oocyte quantification

Staged A1 25°C-raised F1 hermaphrodites were generated as above, fixed in Carnoy's solution and stained with DAPI as previously described (Narbonne & Roy, 2006). Briefly, after

fixation solution removal and 3 5-minute PBST washes, samples were incubated 30 minutes at room temperature in the dark in a DAPI (0.1mg/ml in PBST) solution. After a final 5-minute PBST wash, samples were mounted in 3µl Duolink *in situ* mounting medium, sealed with nail polish and stored at -20°C until imaged. The number of diakinesis-stage oocytes (having at least one bivalent chromosome (Labella *et al.*, 2011) per gonad arm was then quantified. Anovulated oocytes with fully condensed chromosomes that were proximal to a diakinesis-stage oocyte were included in the counts.

Complementation tests

Heterozygous *oma-1/nT1*; *oma-2/nT1*; *ghd(-/-)* hermaphrodites were allowed to mate for 24h at 20°C, either with control *oma-1/nT1*; *oma-2/nT1*, or another *oma-1/nT1*; *oma-2/nT1*; *ghd(-/-)* candidate mutant males. Individual fertilized hermaphrodites were picked to separate plates. The resulting late L4-stage *oma-1*; *oma-2* homozygous F1 hermaphrodites, from plates that displayed approximately 50% F1 males, were isolated on a new plate and allowed to grow for an additional 72h at 20°C before the Ghd phenotype was scored.

Image acquisition and processing

For live epifluorescence imaging (Figures 1E-P, 2A-L, 3A-D, 3Q-R and 4C-D), worms were paralyzed by soaking in a 0.1% tetramisole M9 solution and flipped onto a 3% agarose M9 pad positioned on a microscope slide. Images were acquired on an inverted Zeiss Axio Observer.Z1 using a 20x/0.8 numerical aperture dry objective, with a 1µm z-step. Samples were excited by a LED module at 488nm (50% intensity, 100ms exposure) and emission was collected at 500-550nm. Images were stitched using the Zen 2.6 software. Brightness/contrast were uniformly adjusted, and

animals were computationally straightened using the ImageJ software for display purposes. All displayed live epifluorescence micrographs show single focal planes.

For fixed epifluorescence imaging (Figures 3E-I and S1A-E), samples were acquired on an inverted Zeiss Axio Observer Z1 using a 40x/1.4 numerical aperture oil objective with a 1 μm z-step. Samples were excited by a LED module at 353nm (DAPI, 50% intensity, 50ms exposure), 493nm (alexa488, 50% intensity, 50ms exposure) or 557nm (alexa546, 50% intensity, 300ms exposure) and emissions were collected at 420-470nm, 500-550nm and 570-640nm respectively. Images were deconvolved using the Zen 2.6 software Brightness/contrast were uniformly adjusted on ImageJ for display purposes. All displayed fixed epifluorescence micrographs are maximal intensity z-projections.

For live confocal imaging (Figures 4A-B, S3A-H' and S4A-B), hermaphrodites were paralyzed as described above. Slides were sealed with VALAP (1:1:1 vaseline, lanolin, paraffin) and images were acquired within 30 minutes using an inverted Leica SP8 point scanning confocal microscope with a 40x/1.30 numerical aperture oil objective at 0.30 μm z-steps.

For PMK-1::mNG (Figures 4A-B and S3A-D), samples were excited by a 488nm laser (5% intensity) and emission was collected at 507-527nm. Transmitted white light was collected using the same excitation with a PMT trans photoreceptor. For TIR-1::mNG (Figure S3E-H'), samples were excited by a 488nm laser (2% intensity) and emission was collected at 507-528nm. For proximal gonad length measurements (Figure S4A-B), samples were sequentially acquired using a 405nm (0.5% intensity) laser excitation with a 413-463nm emission collection, and a 552nm laser excitation (0.5% intensity) laser excitation with a 574-594nm emission collection. A segmented line from the gonad arm bend to the distal spermatheca, going through the center of each oocyte, was drawn and measured using ImageJ. Only anterior gonad arms were analyzed.

To reduce noise and amplify signal in all confocal acquisitions, each pixel was acquired three times, and the intensity values were averaged by the Las AF software. Brightness/contrast were uniformly adjusted for display purposes using ImageJ. Displayed confocal micrographs are either single focal planes (Figures 4A-B, S3A-D and S3E'-H') or maximal intensity projections (Figures S3E-H and S4A-B). To ensure signal consistency between individuals and samples, only gonad arms located above the intestine were considered.

RNA interference

RNAi screens were conducted as previously described (Fraser *et al.*, 2000; Kamath *et al.*, 2001). Briefly, L4-staged *oma-1/nT1; oma-2/nT1* P0s were picked to 25°C NGM plates supplemented with 25µg/ml carbenicillin and 1mM IPTG and seeded with *E. coli* HT115 either containing an empty L4440 vector or expressing an exon-rich dsRNA sequence targeting a gene of interest. The resulting late L4-staged *oma-1; oma-2* homozygous F1s were isolated on a new plate and allowed to grow for an additional 72h at 25°C before their phenotype was scored. RNAi constructs were obtained from the Ahringer library (Fraser *et al.*, 2000) except for the *nsy-1*, *pmk-1* and *pmk-3* RNAi clones, which were generated as described below. All clones were validated by Sanger sequencing.

Plasmids, transgenesis and CRISPR/Cas9-mediated genome edition

We used the Gibson *et al.*, 2009 protocol (Gibson *et al.*, 2009) for all plasmid assembly, except for pCLT2-3 and pCLT13, which were generated using kinase ligase DpnI (KLD) site-directed mutagenesis (Kunkel *et al.*, 1987; Zheng *et al.*, 2004) on the pDD162 (Dickinson *et al.*, 2013) or pXA1 vectors, respectively. The source DNA and primers that were used to generate all plasmids as well as their microinjection concentrations are indicated in Table S3. Extra-

chromosomal arrays were generated as previously described (Mello *et al.*, 1991) by regular plasmid DNA microinjections at a total concentration of 200 µg/ml using a pKSII as a filler DNA and pCFJ104[Pmyo-3::mCherry] (Frokjaer-Jensen *et al.*, 2008) (5 µg/ml) as a co-injection marker.

TIR-1::mNG fluorescent knockins were generated as previously described (Dickinson *et al.*, 2015). A pCLT1 repair template (self-excising cassette (SEC)::mNG::3xFLAG-TIR-1 homology arms, 10 µg/ml) was co-injected with pCLT2 and pCLT3 constructs (sgRNA-Cas9, each at 25 µg/ml) and pCFJ104[Pmyo-3::mCherry] co-injection marker (5 µg/ml). Following hygromycin (250µg/ml) selection, mCherry negative Rol F1s were isolated on individual plates. F2s were isolated from F1s that segregated 100% Rol progeny. Three independent F2 edited lines were selected and their L1/L2-staged F3 progeny was heat shocked at 34°C for 4 hours for SEC removal.

Sequence alignment

Protein sequences were obtained from Wormbase (Sternberg *et al.*, 2024). Protein alignments were conducted on SnapGene using the Clustal Omega algorithm (Sievers *et al.*, 2011). Conserved domains were obtained from UniprotKB's protein annotation (UniProt, 2025).

Quantification and statistical analyses

Graphs were generated and statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0.2. For each dataset, the Shapiro-Wilk normality test was applied to determine whether it followed a Gaussian distribution. Homoscedasticity was then verified either with an F test when comparing 2 samples, or with the Brown-Forsythe test when comparing >2 samples.

When both normality and homoscedasticity were verified, a parametric test was used (unpaired t-test, when comparing 2 samples). When either normality or homoscedasticity was not

verified, a non-parametric test was used (Kruskal-Wallis' test followed by Dunn's multiple comparisons when comparing >2 samples). Statistical significance was marked by asterisks as follows: one asterisk, $p<0.05$; two asterisks, $p<0.01$; and three asterisks, $p<0.001$.

Except for EMO (Figure 3P) and viable adult progeny (Figure S3I) quantifications, which present single replicates, all presented datasets are a merge of ≥ 2 independent replicates.

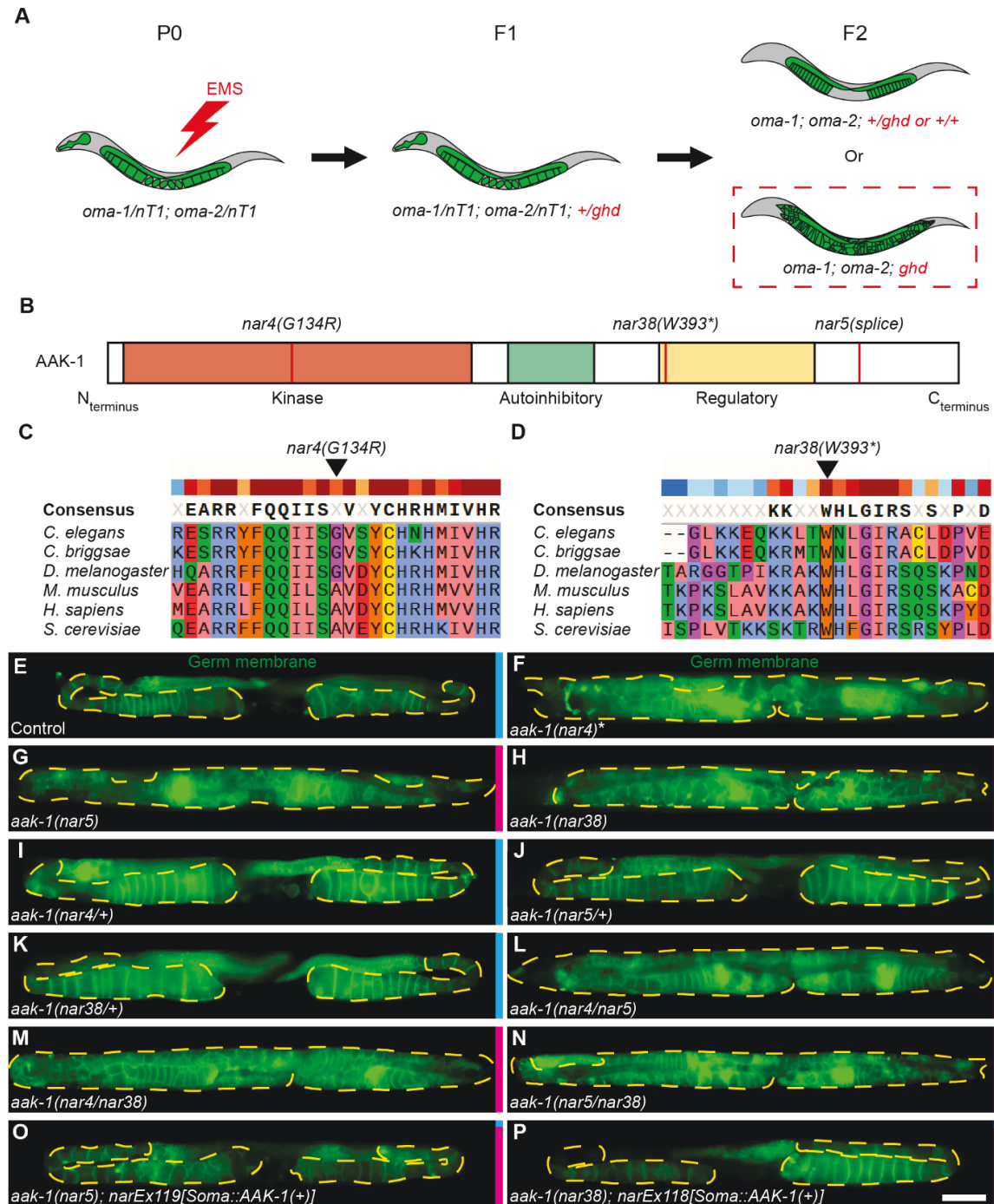


Figure 1. A forward genetic screen to isolate germline homeostasis-defective (*ghd*) mutants. (A) Schematic representation of the forward genetic screening strategy. Complete genotype of the P0 is *cpSi42[Pmex-5::mNG::PLCδ-PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)]II; oma-1(zu405te33)/nT1[qIs51]IV; oma-2(te51)/nT1 V*. The *cpSi42* allele marks germ membranes with green fluorescence. The *qIs51* allele contains *Pmyo-2::GFP*, which is specifically expressed in the pharynx and marks *oma-1/+; oma-2/+* heterozygotes, but not *oma-1; oma-2* homozygotes. EMS, Ethyl Methane Sulfonate. (B) Schematic representation of AAK-1's conserved functional domains. Red vertical bars, EMS-generated alleles. Asterisk, STOP codon. (C-D) Clustal Omega alignments of AAK-1 orthologs showing a high evolutionary conservation around the *nar4* missense (left) and *nar38* nonsense (right) alleles. (E-P) Representative epifluorescence micrographs of A3 hermaphrodites (20°C) of the indicated genotypes, all in the *oma-1; oma-2* background (sample sizes: 14-16-14-24-16-19-17-8-5-9-12-10). Germ membranes are marked in green by *cpSi42*. Yellow dashed lines delineate area occupied by oocytes. Anterior, left; dorsal, up. Scale bar, 100µm. A quantification of the phenotype's penetrance is shown as a colored vertical bar on the right (Blue, Oma; Red, Ghd). All strains contain *cpSi42[Pmex-5::mNG::PLCδ-PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)]*, *oma-1(zu405te33)*, and *oma-2(te51)*. *, Contains a second-site *tir-1(nar65)* mutation (see Figure 2). (I-K) F1 cross-progeny of *oma-1/+; oma-2/+; ghd* hermaphrodites mated with control *oma-1/+; oma-2/+* males. (L-N) F1 cross progeny from reciprocal *oma-1/+; oma-2/+; ghd* crosses. (O-P) Animals were injected with a *Psur-5::GFP::AAK-1A(+)* rescue plasmid.

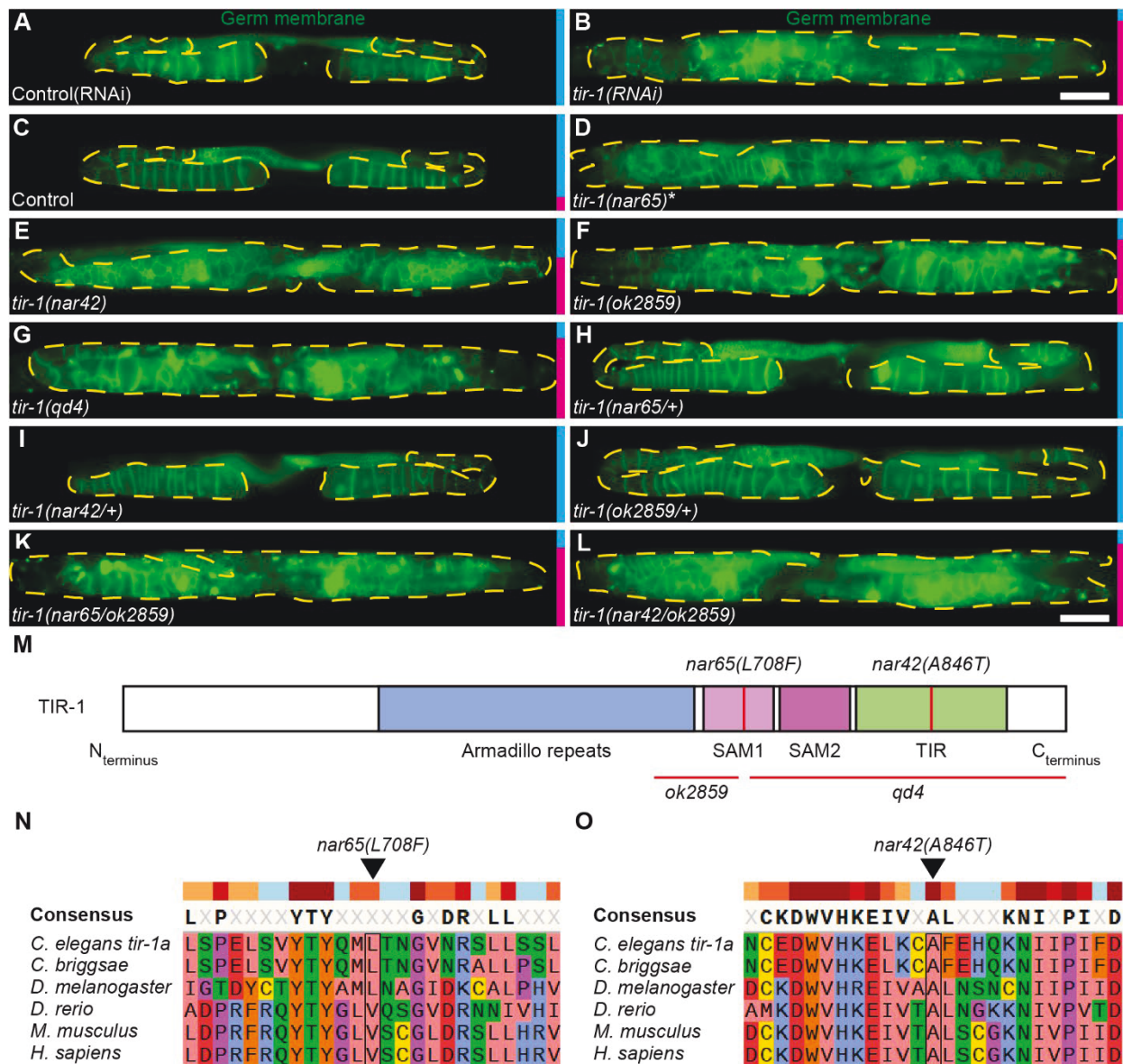


Figure 2. TIR-1/SARM1 prevents the formation of differentiated germline tumors. (A-L) Representative epifluorescence micrographs of A3 hermaphrodites (A-B: 25°C; C-L: 20°C) of the indicated genotypes, all in the *oma-1*; *oma-2* background (sample sizes: 12-32-14-16-22-36-12-16-21-20-11-10). Germ membranes are marked in green by *cpSi42*. Yellow dashed lines delineate area occupied by oocytes. Anterior, left; dorsal, up. Scale bar, 100µm. A quantification of the phenotype's penetrance is shown as a colored vertical bar on the right (Blue, Oma; Red, Ghd). All strains contain *cpSi42*[*Pmex-5::mNG::PLCδ-PH::tbb-2* 3'UTR + *unc-119*(+)], *oma-1*(*zu405te33*), and *oma-2*(*te51*). *, Contains a second-site *aak-1*(*nar4*) mutation. (H-J) F1 cross-progeny of *oma-1*/+; *oma-2*/+; *ghd* hermaphrodites mated with control *oma-1*/+; *oma-2*/+ males. (K-L) F1 cross progeny from reciprocal *oma-1*/+; *oma-2*/+; *ghd* crosses. (M) Schematic representation of TIR-1's conserved domains. SAM, Sterile Alpha Motif. TIR, Toll and Interleukine-1 Receptor domain. Red vertical bars, EMS-generated alleles. Red horizontal bars, Deletions. (N-O) Clustal Omega alignments of TIR-1 orthologs showing evolutionary conservation around the *nar65* (left) and *nar42* (right) substitutions.

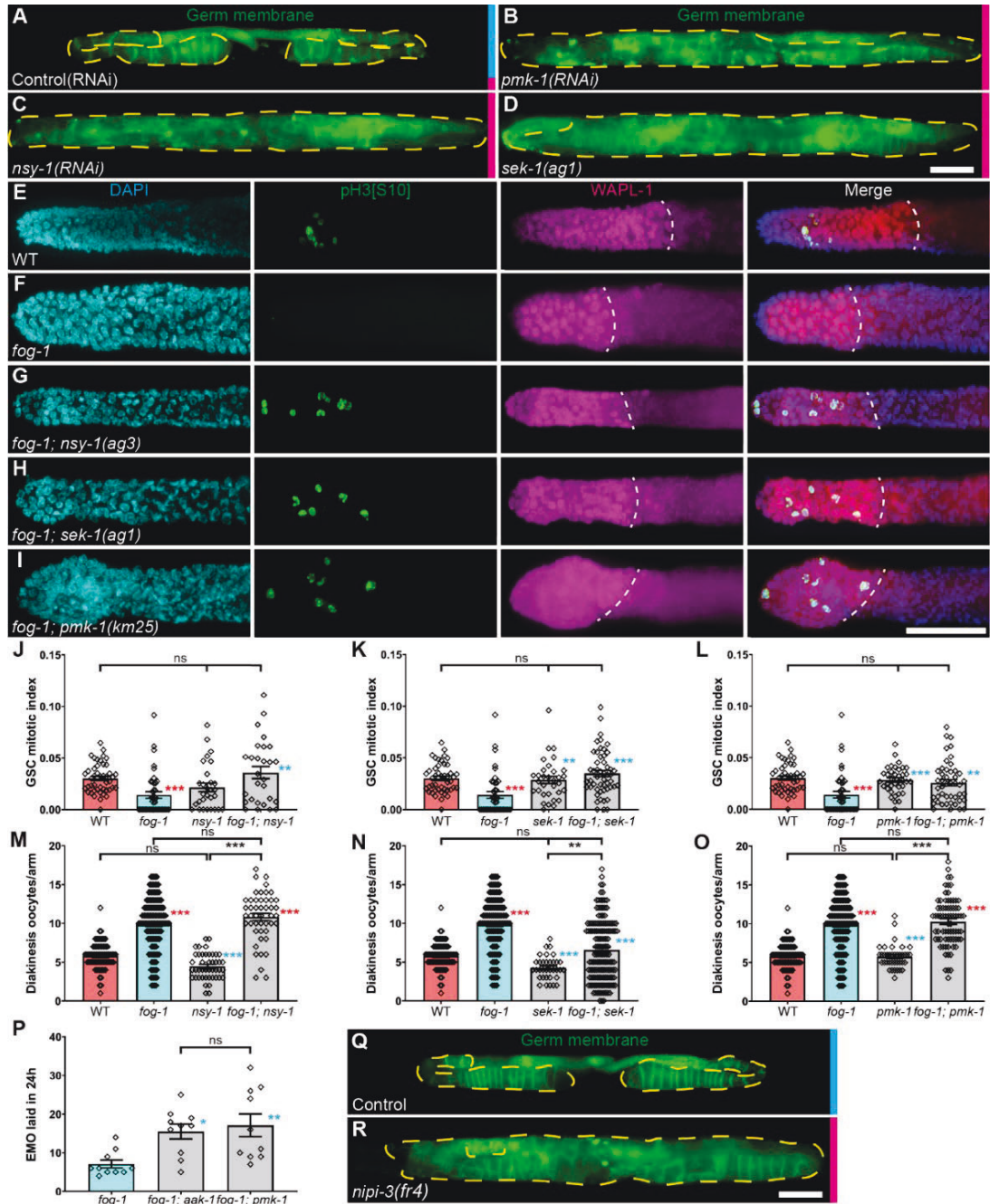


Figure 3. Germline homeostasis requires the canonical PMK-1/p38 signaling cascade and the NIP1-3/TRIB1 pseudokinase. (A-D) Representative epifluorescence micrographs of A3 hermaphrodites (A-C: 25°C; D: 20°C) of the indicated genotypes, all in the *oma-1; oma-2* background (sample sizes: 12-5-11-14). Yellow dashed lines delineate area occupied by oocytes. Anterior, left; dorsal, up. Scale bar, 100µm. A quantification of the phenotype's penetrance is shown as a colored vertical bar on the right (Blue, *Oma*; Red, *Ghd*). All strains contain *cpSi42[Pmex-5::mNG::PLCδ-PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)]*, *oma-1(zu405te33)*, and *oma-2(te51)*. **(E-I)** Representative epifluorescence micrographs of distal germlines dissected from A1 (25°C) hermaphrodites of the indicated genotypes, stained with DAPI (DNA; blue), anti-phospho[S10] histone H3 (M-phase cells (Sauve *et al.*, 1999); green) and anti-WAPL-1 (proliferative cells (Crawley *et al.*, 2016; Kocsisova *et al.*, 2018); magenta). Distal is left. **(J-L)** Average GSC MIs for each of the indicated genotype (sample sizes: (J) 45-41-29-28; (K) 45-41-32-51; (L) 45-41-37-46). **(M-O)** Average diakinesis oocyte per gonad arm for each of the indicated genotype (sample size: (M) 76-134-44-47; (N) 76-134-34-141; (O) 76-134-38-74). **(P)** Average number of EMO = endomitotic oocytes, laid by hermaphrodites between A1 and A2 stages (25°C, sample size: 10-10-10). (J-P) Each bar represents the mean ± SEM, and each point represents (J-O) a different gonad arm, or (P) the total number of EMO laid by a single adult. Red asterisks show statistical significance ($p < 0.05$) vs wild-type; blue vs *fog-1* (Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparisons). Double asterisks, $p < 0.01$; triple asterisk, $p < 0.001$. Ns, not significant. Alleles: *fog-1(q253)*, *nsy-1(ag3)*, *pmk-1(km25)*, *sek-1(ag1)*. **(Q-R)** Representative epifluorescence micrographs of A3 hermaphrodites (20°C) of the indicated genotypes, all in the *oma-1; oma-2* background (sample sizes: 14-13). Germ membranes are marked in green by *cpSi42*. Presented as in (A-D).

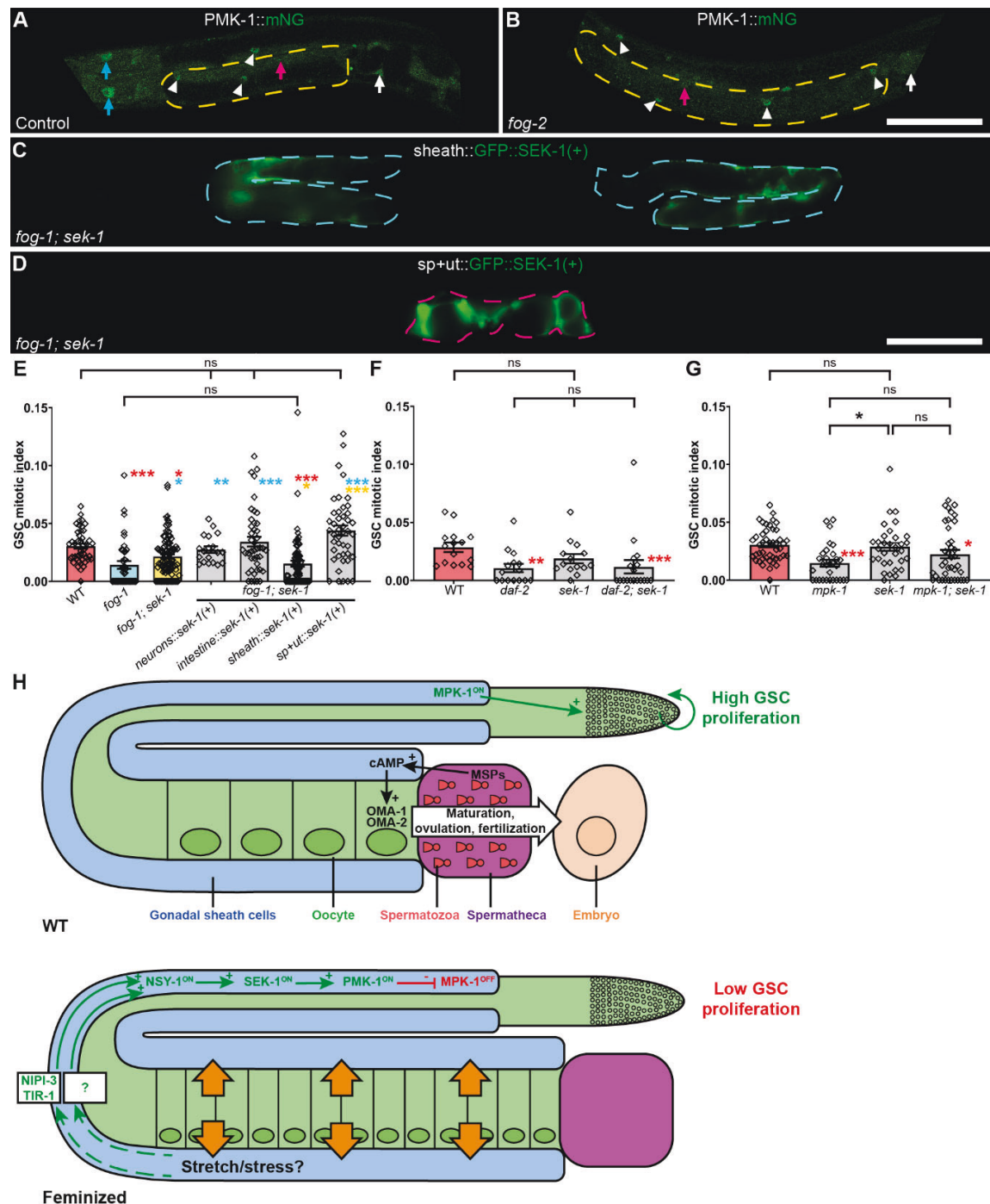


Figure 4. PMK-1/p38 signaling non-autonomously promotes GSC quiescence from the gonadal sheath, upstream of MPK-1/ERK. (A-B) Representative confocal micrographs of A1 hermaphrodites (25°C) for each of the indicated genotypes. Anterior is to the left and dorsal up. White triangles indicate gonadal sheath nuclei. Arrows indicate other somatic structures: blue, intestine; red, hypodermis; white, spermatheca. Yellow dashed lines delineate areas occupied by oocytes. Scale bar, 50µm. Both strains carry the *pmk-1(re170)[pmk-1::mNG::3xFlag]* fluorescent reporter. (C) Hermaphrodites were injected with a *Plim-7::GFP::SEK-1(+)* rescue transgene. Blue dashed lines delineate gonadal sheath cells. (D) Hermaphrodites were injected with a *Pfos-1::GFP::SEK-1(+)* rescue transgene. Red dashed line delineates sp+ut = spermatheca and uterus. Anterior, left; dorsal, up. Scale bars, 100 µm. (E-G) Average GSC MIs for each of the indicated genotype (sample sizes: (E) 45-41-97-19-43-76-44; (F) 15-15-14-18; (G) 45-30-32-39). Each bar represents the mean ± SEM, and each point represents an individual gonad arm. Red asterisks show statistical significance ($p < 0.05$) vs wild-type; blue vs *fog-1*; yellow vs *fog-1; sek-1* (Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparisons). Double asterisks, $p < 0.01$; triple asterisk, $p < 0.001$. Ns, not significant. Alleles: *daf-2(e1370)*, *fog-1(q253)*, *fog-2(oz40)*, *mpk-1(gal17)*, (E) *sek-1(km4)*, (F-G) *sek-1(ag1)*. (H) Proposed model for homeostatic downregulation of GSC proliferation by the canonical *pmk-1/p38* signaling cascade. MSP, major sperm proteins. Green arrows, activation. Red bars, inhibition. Yellow arrows, mechanical force exerted on the gonadal sheath cells by the accumulating oocytes.

References

- Aguirre-Ghiso JA, Estrada Y, Liu D, Ossowski L (2003) ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res* 63: 1684-1695
- Aguirre-Ghiso JA, Liu D, Mignatti A, Kovalski K, Ossowski L (2001) Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. *Mol Biol Cell* 12: 863-879
- Aikawa R, Nagai T, Kudoh S, Zou Y, Tanaka M, Tamura M, Akazawa H, Takano H, Nagai R, Komuro I (2002) Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation. *Hypertension* 39: 233-238
- Ankawa R, Goldberger N, Yosefzon Y, Koren E, Yusupova M, Rosner D, Feldman A, Baror-Sebban S, Buginim Y, Simon DJ *et al* (2021) Apoptotic cells represent a dynamic stem cell niche governing proliferation and tissue regeneration. *Dev Cell* 56: 1900-1916 e1905
- Barton MK, Kimble J (1990) fog-1, a regulatory gene required for specification of spermatogenesis in the germ line of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 125: 29-39
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71-94
- Chen J, Li Y, Wu J, Liu Y, Kang S (2021) Whole-exome sequencing reveals potential germline and somatic mutations in 60 malignant ovarian germ cell tumorsdagger. *Biol Reprod* 105: 164-178
- Chuang CF, Bargmann CI (2005) A Toll-interleukin 1 repeat protein at the synapse specifies asymmetric odorant receptor expression via ASK1 MAPKKK signaling. *Genes Dev* 19: 270-281
- Church DL, Guan KL, Lambie EJ (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: 2525-2535
- Cingolani P, Patel VM, Coon M, Nguyen T, Land SJ, Ruden DM, Lu X (2012a) Using *Drosophila melanogaster* as a Model for Genotoxic Chemical Mutational Studies with a New Program, SnpSift. *Front Genet* 3: 35
- Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X, Ruden DM (2012b) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 6: 80-92
- Cinquin A, Chiang M, Paz A, Hallman S, Yuan O, Vysniauskaite I, Fowlkes CC, Cinquin O (2016) Intermittent Stem Cell Cycling Balances Self-Renewal and Senescence of the *C. elegans* Germ Line. *PLoS Genet* 12: e1005985
- Clouet A, Narbonne P (2023) Regulation of Stem Cell Proliferation by p38 MAPK Signaling. *Med Discoveries* 2: 1096
- Community TG (2024) The Galaxy platform for accessible, reproducible, and collaborative data analyses: 2024 update. *Nucleic Acids Research* 52: W83-W94
- Couillault C, Pujol N, Reboul J, Sabatier L, Guichou JF, Kohara Y, Ewbank JJ (2004) TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat Immunol* 5: 488-494
- Crawley O, Barroso C, Testori S, Ferrandiz N, Silva N, Castellano-Pozo M, Jaso-Tamame AL, Martinez-Perez E (2016) Cohesin-interacting protein WAPL-1 regulates meiotic chromosome structure and cohesion by antagonizing specific cohesin complexes. *Elife* 5: e10851
- Czech VL, O'Connor LC, Philippon B, Norman E, Byrne AB (2023) TIR-1/SARM1 inhibits axon regeneration and promotes axon degeneration. *Elife* 12
- Detwiler MR, Reuben M, Li X, Rogers E, Lin R (2001) Two zinc finger proteins, OMA-1 and OMA-2, are redundantly required for oocyte maturation in *C. elegans*. *Dev Cell* 1: 187-199

Dickinson DJ, Pani AM, Heppert JK, Higgins CD, Goldstein B (2015) Streamlined Genome Engineering with a Self-Excising Drug Selection Cassette. *Genetics* 200: 1035-1049

Dickinson DJ, Ward JD, Reiner DJ, Goldstein B (2013) Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat Methods* 10: 1028-1034

Essuman K, Summers DW, Sasaki Y, Mao X, DiAntonio A, Milbrandt J (2017) The SARM1 Toll/Interleukin-1 Receptor Domain Possesses Intrinsic NAD(+) Cleavage Activity that Promotes Pathological Axonal Degeneration. *Neuron* 93: 1334-1343 e1335

Figley MD, Gu W, Nanson JD, Shi Y, Sasaki Y, Cunnea K, Malde AK, Jia X, Luo Z, Saikot FK *et al* (2021) SARM1 is a metabolic sensor activated by an increased NMN/NAD(+) ratio to trigger axon degeneration. *Neuron* 109: 1118-1136 e1111

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

Frokjaer-Jensen C, Davis MW, Hopkins CE, Newman BJ, Thummel JM, Olesen SP, Grunnet M, Jorgensen EM (2008) Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* 40: 1375-1383

Gerds J, Brace EJ, Sasaki Y, DiAntonio A, Milbrandt J (2015) SARM1 activation triggers axon degeneration locally via NAD(+) destruction. *Science* 348: 453-457

Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, 3rd, Smith HO (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6: 343-345

Gottlieb S, Ruvkun G (1994) *daf-2*, *daf-16* and *daf-23*: genetically interacting genes controlling Dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 137: 107-120

Gruden G, Zonca S, Hayward A, Thomas S, Maestrini S, Gnudi L, Viberti GC (2000) Mechanical stretch-induced fibronectin and transforming growth factor-beta1 production in human mesangial cells is p38 mitogen-activated protein kinase-dependent. *Diabetes* 49: 655-661

Hiatt SM, Duren HM, Shyu YJ, Ellis RE, Hisamoto N, Matsumoto K, Kariya K, Kerppola TK, Hu CD (2009) *Caenorhabditis elegans* FOS-1 and JUN-1 regulate *plc-1* expression in the spermatheca to control ovulation. *Mol Biol Cell* 20: 3888-3895

Hoffman L, Jensen CC, Yoshigi M, Beckerle M (2017) Mechanical signals activate p38 MAPK pathway-dependent reinforcement of actin via mechanosensitive HspB1. *Mol Biol Cell* 28: 2661-2675

Hsu YC, Pasolli HA, Fuchs E (2011) Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle. *Cell* 144: 92-105

Hubbard EJ, Greenstein D (2005) Introduction to the germ line. *WormBook* 1: 1-4

Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275: 90-94

Inoue H, Hisamoto N, An JH, Oliveira RP, Nishida E, Blackwell TK, Matsumoto K (2005) The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes Dev* 19: 2278-2283

Jiang H, Patel PH, Kohlmaier A, Grenley MO, McEwen DG, Edgar BA (2009) Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut. *Cell* 137: 1343-1355

Johnston EF, Gillis TE (2020) Short-term cyclical stretch phosphorylates p38 and ERK1/2 MAPKs in cultured fibroblasts from the hearts of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biol Open* 9

Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG, Ahringer J (2001) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* 2: RESEARCH0002

Kennedy BP, Aamodt EJ, Allen FL, Chung MA, Heschl MF, McGhee JD (1993) The gut esterase gene (*ges-1*) from the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *J Mol Biol* 229: 890-908

Kim DH, Feinbaum R, Alloing G, Emerson FE, Garsin DA, Inoue H, Tanaka-Hino M, Hisamoto N, Matsumoto K, Tan MW *et al* (2002) A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science* 297: 623-626

Kim KW, Thakur N, Piggott CA, Omi S, Polanowska J, Jin Y, Pujol N (2016) Coordinated inhibition of C/EBP by Tribbles in multiple tissues is essential for *Caenorhabditis elegans* development. *BMC Biol* 14: 104

Kimble J, Edgar L, Hirsh D (1984) Specification of male development in *Caenorhabditis elegans*: the *fem* genes. *Dev Biol* 105: 234-239

Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G (1997) *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277: 942-946

Kocsisova Z, Mohammad A, Kornfeld K, Schedl T (2018) Cell Cycle Analysis in the *C. elegans* Germline with the Thymidine Analog EdU. *J Vis Exp*

Kook SH, Lee HJ, Chung WT, Hwang IH, Lee SA, Kim BS, Lee JC (2008) Cyclic mechanical stretch stimulates the proliferation of C2C12 myoblasts and inhibits their differentiation via prolonged activation of p38 MAPK. *Mol Cells* 25: 479-486

Korta DZ, Tuck S, Hubbard EJ (2012) S6K links cell fate, cell cycle and nutrient response in *C. elegans* germline stem/progenitor cells. *Development* 139: 859-870

Kumar A, Chaudhry I, Reid MB, Boriek AM (2002) Distinct signaling pathways are activated in response to mechanical stress applied axially and transversely to skeletal muscle fibers. *J Biol Chem* 277: 46493-46503

Kunkel TA, Roberts JD, Zakour RA (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol* 154: 367-382

Labella S, Woglar A, Jantsch V, Zetka M (2011) Polo kinases establish links between meiotic chromosomes and cytoskeletal forces essential for homolog pairing. *Dev Cell* 21: 948-958

Lackner MR, Kornfeld K, Miller LM, Horvitz HR, Kim SK (1994) A MAP kinase homolog, *mpk-1*, is involved in ras-mediated induction of vulval cell fates in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 8: 160-173

Lal H, Verma SK, Smith M, Guleria RS, Lu G, Foster DM, Dostal DE (2007) Stretch-induced MAP kinase activation in cardiac myocytes: differential regulation through β 1-integrin and focal adhesion kinase. *J Mol Cell Cardiol* 43: 137-147

Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9: 357-359

Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10: R25

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

Liang F, Gardner DG (1999) Mechanical strain activates BNP gene transcription through a p38/NF- κ B-dependent mechanism. *J Clin Invest* 104: 1603-1612

Liberati NT, Fitzgerald KA, Kim DH, Feinbaum R, Golenbock DT, Ausubel FM (2004) Requirement for a conserved Toll/interleukin-1 resistance domain protein in the *Caenorhabditis elegans* immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6593-6598

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

Maduro M, Pilgrim D (1995) Identification and cloning of unc-119, a gene expressed in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Genetics* 141: 977-988

Maier W, Moos K, Seifert M, Baumeister R (2014) MiModD-mutation identification in model organism genomes. *Computer Software*: <http://SourceForge.net>

Malinow RA, Zhu M, Jin Y, Kim KW (2022) Forward genetic screening identifies novel roles for N-terminal acetyltransferase C and histone deacetylase in *C. elegans* development. *Sci Rep* 12: 16438

Martinez-Limon A, Joaquin M, Caballero M, Posas F, de Nadal E (2020) The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 21

McEwan DL, Feinbaum RL, Stroustrup N, Haas W, Conery AL, Anselmo A, Sadreyev R, Ausubel FM (2016) Tribbles ortholog NIPI-3 and bZIP transcription factor CEBP-1 regulate a *Caenorhabditis elegans* intestinal immune surveillance pathway. *BMC Biol* 14: 105

Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V (1991) Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* 10: 3959-3970

Mink M, Fogelgren B, Olszewski K, Maroy P, Csiszar K (2001) A novel human gene (SARM) at chromosome 17q11 encodes a protein with a SAM motif and structural similarity to Armadillo/beta-catenin that is conserved in mouse, *Drosophila*, and *Caenorhabditis elegans*. *Genomics* 74: 234-244

Mondal BC, Mukherjee T, Mandal L, Evans CJ, Sinenko SA, Martinez-Agosto JA, Banerjee U (2011) Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. *Cell* 147: 1589-1600

Morale MG, da Silva Abjaude W, Silva AM, Villa LL, Boccardo E (2018) HPV-transformed cells exhibit altered HMGB1-TLR4/MyD88-SARM1 signaling axis. *Sci Rep* 8: 3476

Morale MG, Tamura RE, Cintra R, Araujo NM, Villa LL (2022) TLR4 and SARM1 modulate survival and chemoresistance in an HPV-positive cervical cancer cell line. *Sci Rep* 12: 6714

Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G (1996) A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 382: 536-539

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

Narbonne P, Maddox PS, Labbe JC (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: e1006738

Narbonne P, Roy R (2006) Inhibition of germline proliferation during *C. elegans* dauer development requires PTEN, LKB1 and AMPK signalling. *Development* 133: 611-619

Osterloh JM, Yang J, Rooney TM, Fox AN, Adalbert R, Powell EH, Sheehan AE, Avery MA, Hackett R, Logan MA *et al* (2012) dSarm/Sarm1 is required for activation of an injury-induced axon death pathway. *Science* 337: 481-484

Paradis S, Ailion M, Toker A, Thomas JH, Ruvkun G (1999) A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 13: 1438-1452

Paradis S, Ruvkun G (1998) *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev* 12: 2488-2498

Peterson ND, Ico JD, Salisbury JE, Rodriguez T, Thompson PR, Pukkila-Worley R (2022) Pathogen infection and cholesterol deficiency activate the *C. elegans* p38 immune pathway through a TIR-1/SARM1 phase transition. *Elife* 11

Pujol N, Cypowyj S, Ziegler K, Millet A, Astrain A, Goncharov A, Jin Y, Chisholm AD, Ewbank JJ (2008) Distinct innate immune responses to infection and wounding in the *C. elegans* epidermis. *Curr Biol* 18: 481-489

Robinson-Thiewes S, Dufour B, Martel PO, Lechasseur X, Brou AAD, Roy V, Chen Y, Kimble J, Narbonne P (2021) Non-autonomous regulation of germline stem cell proliferation by somatic MPK-1/MAPK activity in *C. elegans*. *Cell Rep* 35: 109162

Sauve DM, Anderson HJ, Ray JM, James WM, Roberge M (1999) Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH2-terminal domain during mitotic chromosome condensation. *J Cell Biol* 145: 225-235

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

Shaner NC, Lambert GG, Chammas A, Ni Y, Cranfill PJ, Baird MA, Sell BR, Allen JR, Day RN, Israelsson M *et al* (2013) A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat Methods* 10: 407-409

Sherwood DR, Butler JA, Kramer JM, Sternberg PW (2005) FOS-1 promotes basement-membrane removal during anchor-cell invasion in *C. elegans*. *Cell* 121: 951-962

Shim J, Gururaja-Rao S, Banerjee U (2013) Nutritional regulation of stem and progenitor cells in *Drosophila*. *Development* 140: 4647-4656

Shin H, Kaplan REW, Duong T, Fakieh R, Reiner DJ (2018) Ral Signals through a MAP4 Kinase-p38 MAP Kinase Cascade in *C. elegans* Cell Fate Patterning. *Cell Rep* 24: 2669-2681 e2665

Shivers RP, Kooistra T, Chu SW, Pagano DJ, Kim DH (2009) Tissue-specific activities of an immune signaling module regulate physiological responses to pathogenic and nutritional bacteria in *C. elegans*. *Cell Host Microbe* 6: 321-330

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J *et al* (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7: 539

Soltanmohammadi N, Wang S, Schumacher B (2022) Somatic PMK-1/p38 signaling links environmental stress to germ cell apoptosis and heritable euploidy. *Nat Commun* 13: 701

Stapleton D, Balan I, Pawson T, Sicheri F (1999) The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization. *Nat Struct Biol* 6: 44-49

Sternberg PW, Van Auken K, Wang Q, Wright A, Yook K, Zarowiecki M, Arnaboldi V, Becerra A, Brown S, Cain S *et al* (2024) WormBase 2024: status and transitioning to Alliance infrastructure. *Genetics* 227

Tao L, Yang G, Sun T, Jie T, Zhu C, Yu H, Cheng Y, Yang Z, Xu M, Jiang Y *et al* (2023) Capsaicin receptor TRPV1 maintains quiescence of hepatic stellate cells in the liver via recruitment of SARM1. *J Hepatol* 78: 805-819

Tomasetti C, Li L, Vogelstein B (2017) Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* 355: 1330-1334

Tomasetti C, Vogelstein B (2015) Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 347: 78-81

Tse-Kang SY, Wani KA, Peterson ND, Page A, Humphries F, Pukkila-Worley R (2024) Intestinal immunity in *C. elegans* is activated by pathogen effector-triggered aggregation of the guard protein TIR-1 on lysosome-related organelles. *Immunity* 57: 2280-2295 e2286

UniProt C (2025) UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Res* 53: D609-D617

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

Veriepe J, Fossouo L, Parker JA (2015) Neurodegeneration in *C. elegans* models of ALS requires TIR-1/Sarm1 immune pathway activation in neurons. *Nat Commun* 6: 7319

Voutev R, Keating R, Hubbard EJ, Vallier LG (2009) Characterization of the *Caenorhabditis elegans* Islet LIM-homeodomain ortholog, *lim-7*. *FEBS Lett* 583: 456-464

Wang S, Tang M, Pei B, Xiao X, Wang J, Hang H, Wu L (2008) Cadmium-induced germline apoptosis in *Caenorhabditis elegans*: the roles of HUS1, p53, and MAPK signaling pathways. *Toxicol Sci* 102: 345-351

Wernig F, Mayr M, Xu Q (2003) Mechanical stretch-induced apoptosis in smooth muscle cells is mediated by beta1-integrin signaling pathways. *Hypertension* 41: 903-911

Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D (2003) LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 13: 2004-2008

Wu C, Karakuzu O, Garsin DA (2021) Tribbles pseudokinase NIPI-3 regulates intestinal immunity in *Caenorhabditis elegans* by controlling SKN-1/Nrf activity. *Cell Rep* 36: 109529

Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, Tong L (2000) Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 408: 111-115

Zetka MC, Kawasaki I, Strome S, Muller F (1999) Synapsis and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* require HIM-3, a meiotic chromosome core component that functions in chromosome segregation. *Genes Dev* 13: 2258-2270

Zhan M, Jin B, Chen SE, Reecy JM, Li YP (2007) TACE release of TNF-alpha mediates mechanotransduction-induced activation of p38 MAPK and myogenesis. *J Cell Sci* 120: 692-701

Zheng L, Baumann U, Reymond JL (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res* 32: e115

Supplemental information

Non-autonomous PMK-1/p38 MAPK signaling ensures homeostatic downregulation of germline stem cell proliferation in *C. elegans*

Authors

Alexandre Clouet, Matthieu Valet, Benjamin Dufour, Janina Rieger, Xavier Lechasseur, Aurelia
Thérèse Condomat Zoumabo, Lloyd Venceslas Fotso Dzuna, Alexane Murray, Jichao Deng, Pier-
Olivier Martel and Patrick Narbonne

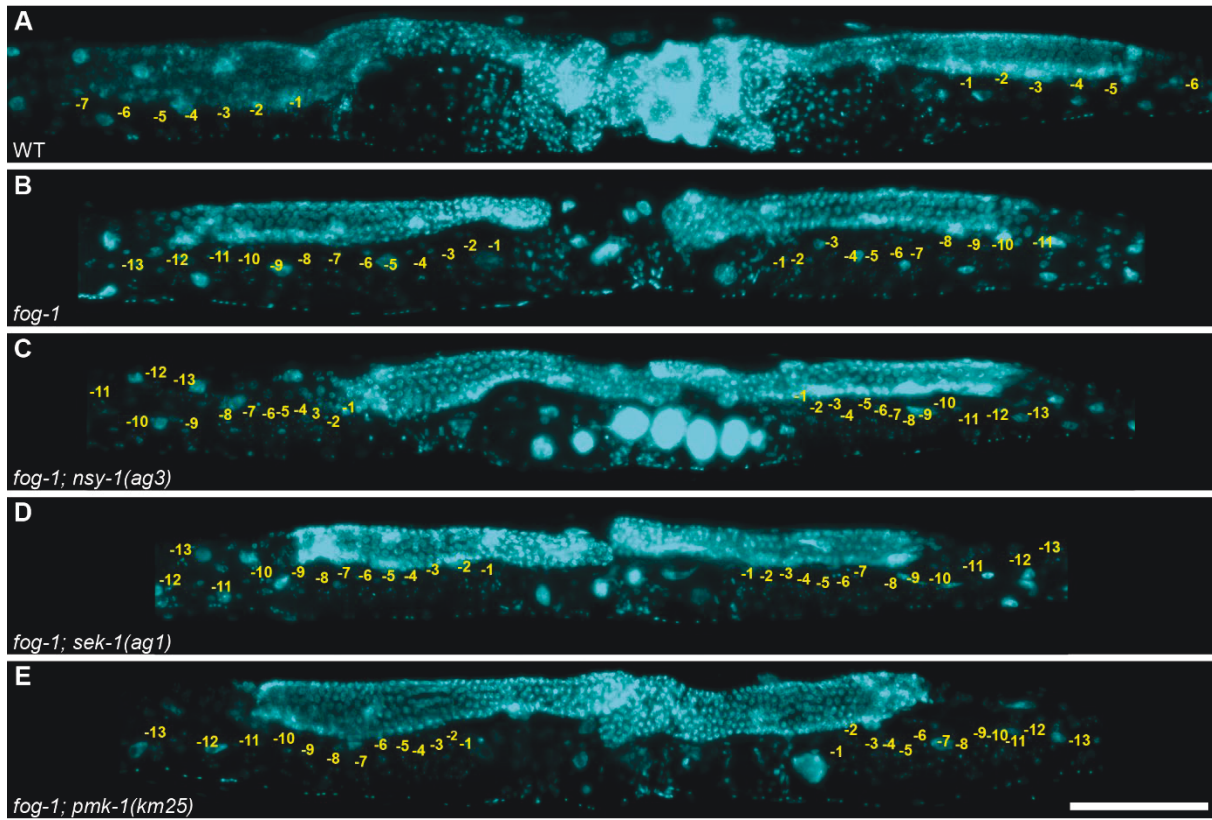
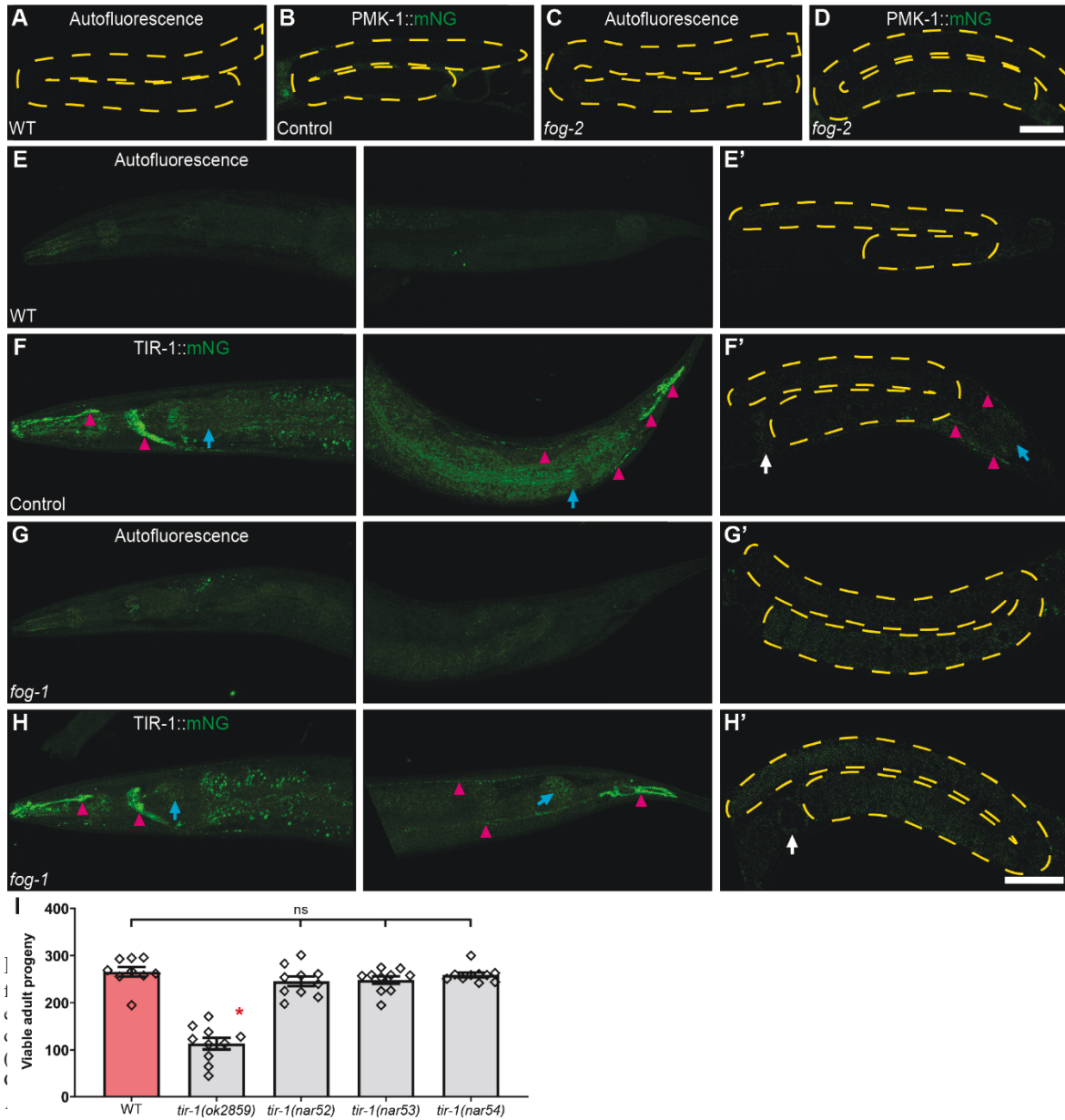


Figure S1. Feminized PMK-1/p38 signaling double mutants accumulate diakinesis oocyte. (A-E) Representative epifluorescence micrographs of A1 hermaphrodites (25°C) of the indicated genotypes, stained with DAPI (DNA; blue). Yellow numbers indicate diakinesis-staged oocytes. Anterior, left; dorsal, up. Scale bar, 100µm. Allele: *fog-1(q253)*.



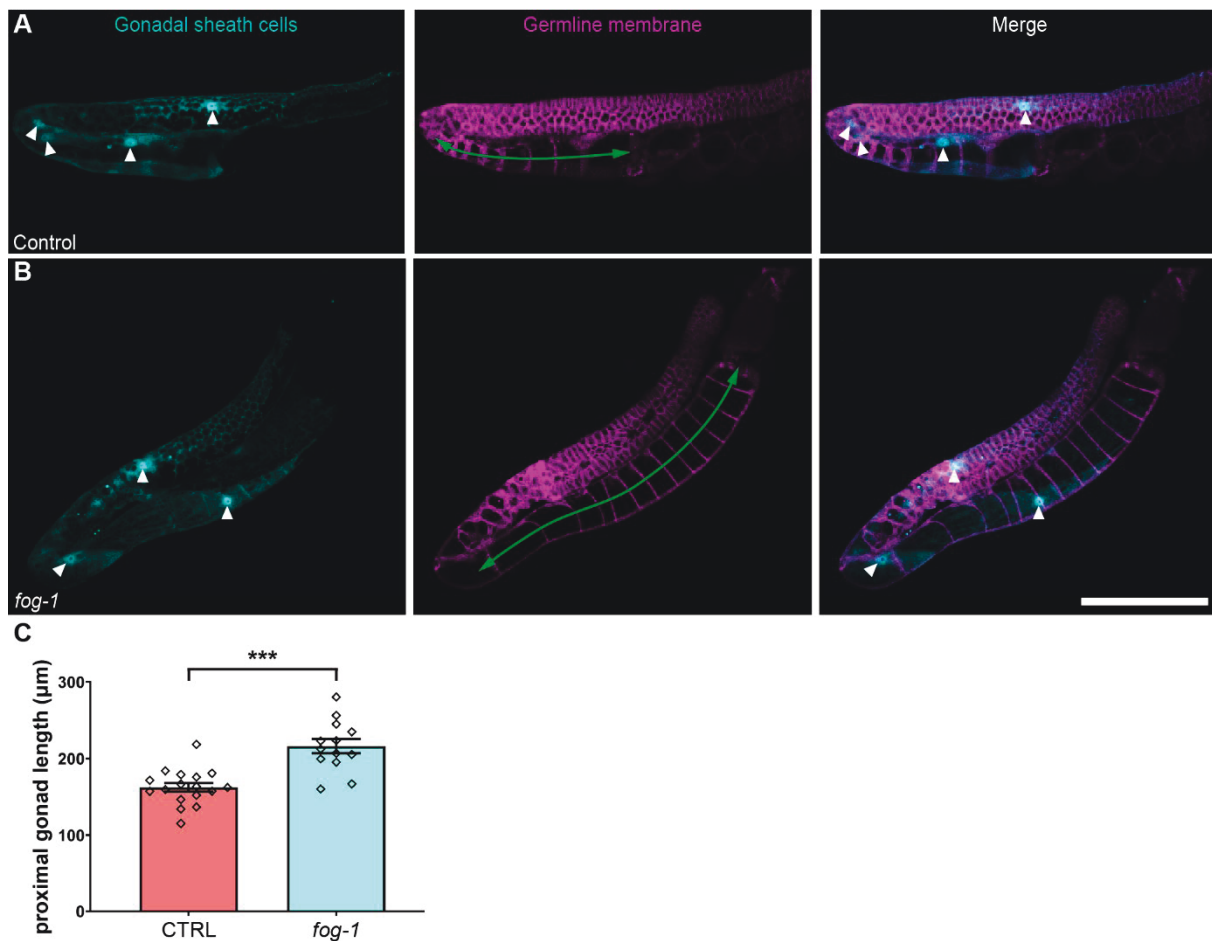


Figure S4. Oocyte accumulation is linked to proximal sheath cells stretching. (A-B) Representative confocal micrographs of A1 hermaphrodites (25°C) for each of the indicated genotypes. (A, B) gonadal sheath cells are marked in blue by *narEx110*. White triangles indicate gonadal sheath cells nuclei. Germ cells are labelled in red with *cpSi20*. Green double arrows outline the proximal gonad. Anterior, left; dorsal, up. Scale bar, 50 μm. Both strains contain *narEx110*[*Plim-7::BFP*; *Pmyo-2::GFP*] and *cpSi20*[*Pmex-5::TAGRFPT::PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)*]. (C) Average proximal gonad length of A1 hermaphrodites (25°C) for each of the indicated genotypes (sample sizes: 17 and 13). Each bar represents the mean ± SEM, and each point represents an individual anterior gonad arm. Triple asterisks show statistical significance between the two samples (unpaired t-test). Allele: *fog-1*(*q253*).

Table S1: RNAi screen of multi-hit candidates identifies *tir-1* as being implicated in germline homeostatic signaling

RNAi-targeted genes	Mutants	Human homolog(s)	Oocyte hyperaccumulation*
<i>aak-1</i>	<i>nar4</i> , 5, 38	PRKAA2	+
<i>adt-1</i>	<i>nar1</i> , 4	ADAMTS18	-
<i>agef-1</i>	<i>nar1</i> , 2	ARFGEF2	-
<i>C24A3.4</i>	<i>nar4</i> , 37	AMACR	-
<i>C46A5.4</i>	<i>nar1</i> , 36	PXDN	-
<i>cla-1</i>	<i>nar2</i> , 33, 42, 43	RIMS2	-
<i>ctf-18</i>	<i>nar3</i> , 37	CHTF18	-
<i>dig-1</i>	<i>nar1</i> , 4, 35, 37	PTPRF	-
<i>F25G6.9</i>	<i>nar33</i> , 43		-
<i>fbxa-136</i>	<i>nar5</i> , 40		-
<i>irlid-45</i>	<i>nar3</i> , 39		-
<i>lips-2</i>	<i>nar1</i> , 43		-
<i>myo-5</i>	<i>nar3</i> , 4, 33	MYH4	-
<i>nas-19</i>	<i>nar1</i> , 3	TLL1	-
<i>nep-1</i>	<i>nar34</i> , 39	ECE1/2, KEL	-
<i>nhr-47</i>	<i>nar4</i> , 36, 43	HNF4A	-
<i>nhr-258</i>	<i>nar2</i> , 37	HNF4A	-
<i>ret-1</i>	<i>nar2</i> , 41	RTN1/3/4	-
<i>T19B10.5</i>	<i>nar32</i> , 34	AHNAK2	-
<i>tir-1</i>	<i>nar65**</i> , 42	SARM1	+
<i>vab-7</i>	<i>nar3</i> , 43	EVX1	-
<i>W01B6.8</i>	<i>nar39</i> , 40		-

*When targeted by RNAi in the *oma-1*; *oma-2* genetic background.

**As the *ghd(nar4)* mutant carried alleles of two *ghd* genes, the *ghd-2/tir-1(nar4)* allele was renamed *tir-1(nar65)*.

Table S2: RNAi screen of *tir-1* interactors highlights *nsy-1* and *pmk-1* as required for homeostatic inhibition of GSC proliferation

RNAi-targeted gene	Human homolog(s)	Oocyte hyperaccumulation*
<i>acdh-1</i>	ACADSB	-
<i>anc-1</i>	SYNE1/2	-
<i>ant-1.1</i>	SLC25A4/5/6/31	-
<i>bar-1</i>	JUP	-
<i>C11E4.7</i>		-
<i>C46H3.2</i>	CASKIN1/ 2	-
<i>ceh-54</i>	VSX1	-
<i>cnk-1</i>	IPCEF1, CNSKR1/2/3	-
<i>DH11.5</i>	SYT12	-
<i>dod-22</i>		-
<i>egl-8</i>	PLCB4	-
<i>egl-15</i>	FGFR1/2/3/4	-
<i>elks-1</i>	ERC1/2	-
<i>F52H2.5</i>		-
<i>F53B1.2</i>	SAMD8	-
<i>fshr-1</i>	FSHR, LHCGR, TSHR	-
<i>gcs-1</i>	GCLC	-
<i>golg-4</i>	GOLGA4	-
<i>gst-4</i>	HPGDS	-
<i>gst-7</i>	HPGDS	-
<i>H23L24.4</i>		-
<i>hsf-1</i>	HSF1/2/4	-
<i>inx-19</i>		-
<i>K07H8.5/8.8</i>		-
<i>kin-18</i>	TAOK1/2/3	-
<i>let-92</i>	PPP2C	-
<i>lin-35</i>	RBL1/2	-
<i>lys-1</i>		-
<i>lys-8</i>		-
<i>mak-1</i>	MAPKAPK3	-

<i>malt-1</i>	MALT1	-
<i>mom-4</i>	MAP3K7	-
<i>nlp-31</i>		-
<i>nmat-1</i>	NMNAT1/2/3	-
<i>nmat-2</i>	NMNAT1/2/3	-
<i>nsy-1</i>	MAP3K5/6/15	+
<i>pal-1</i>	CDX1/2/4	-
<i>pgp-5</i>	ABCB1/4	-
<i>pmk-1</i>	MAPK11/14	+
<i>pmk-2</i>	MAPK11/13/14	-
<i>pmk-3</i>	MAPK14	-
<i>pqn-41</i>		-
<i>prp-21</i>	SF3A1	-
<i>R53.4</i>	ATP5MF	-
<i>rab-1</i>	RAB1A/B/C	-
<i>sel-7</i>		-
<i>set-18</i>	SMYD1/2/3	-
<i>shn-1</i>	SHANK1/2/3	-
<i>skn-1</i>	NFE2/2L1/2L2/2L3	-
<i>sur-6</i>	PPP2R2	-
<i>syd-2</i>	PPFIA1/2/3/4	-
<i>sysm-1</i>		-
<i>T09A12.1</i>		-
<i>T24B8.3</i>		-
<i>tph-1</i>	TPH1/2	-
<i>zak-1</i>	MAP3K20	-
<i>ZK829.3</i>		-

*When targeted by RNAi in the *oma-1*; *oma-2* genetic background.

Table S3: Plasmid design. Related to material and methods

Name	Description	Source material	Primers (5' -> 3')	Injection concentration
pXA1	<i>Psur-5::GFP::AAK-1a</i>	pTG96 (Yochem <i>et al.</i> , 1998)	GGGAACAAAAGCTGGAGtacTG CATTGCTAAATTGCAACC	50 ng/μl
			AAAAGTTCTTCTCCTTTACTCAT TCTGAAAACAAAATGTAAAGTTC	
		pOG5.2	tacatttgtttcagaatgAGTAAAGGAG AAGAACTTTTCACTGG	
			ggttgcaatttagcaatgcagtaCTCCAG CTTTTGTTCCCTTTAGTG	
pCLT1	<i>TIR-1::mNG (repair template)</i>	pDD268 (Dickinson <i>et al.</i> , 2015)	N/A (SpeI + AvrII restriction digest)	10 ng/μl
		N2 gDNA	ACGTTGTAAACGACGGCCAGT CGCCGGCAGATTGGGTGCACA AAGAGC	
			TCGATGCTCCTGAGGCTCCCGA TGCTCCATTCCGATCCGAAGTT GTCGATGCAGAAGGCT	
			CGTGATTACAAGGATGACGATG ACAAGAGATAAGTCTCTTCTTTA ATCAATACATCAAGT	
			GGAAACAGCTATGACCATGTTAT CGATTTTCGTTATTGTTATCAAAT GTTTCTTCACTGTT	
pCLT2	<i>TIR-1::mNG (sgRNA1)</i>	pDD162 (Dickinson <i>et al.</i> , 2013)	AGAAGAGACTTAATTCCGATGTT TTAGAGCTAGAAATAGCAAGT	25 ng/μl (coinjected with pCLT3)
			CAAGACATCTCGCAATAGG	
pCLT3	<i>TIR-1::mNG (sgRNA2)</i>	pDD162	TTAATTCCGATCGGAAGTTGGTT TTAGAGCTAGAAATAGCAAGT	25 ng/μl (coinjected with pCLT2)
			CAAGACATCTCGCAATAGG	
pXA9	<i>Plim-7::GFP::SEK-1(+)</i>	pWI3	ACTGTTTGGCGACGATGATAGC ATTCGTAGAATTCCAACGTG	50 ng/μl

			GAGCGGTATCAGCTCACTCAAA G	
			GATAACCGTATTACCGCCTTTGA GTG	
			cttacCTTTTCGCTCCATaagcttGAT ATCGAATTCCTGC	
		N2 gDNA	GGAATTCGATATCaagcttATGGA GCGAAAAGgtaag	
			GGAATTCTACGAATGCTATCATC GTCGCCAAACAG	
<i>nsy-1(RNAi)</i>		L4440 (Dr Andrew Fire lab)	CTGCTCAGTATTGGTGTGGgat atcgaattcctgcagc	N/A
			GTGGTAGAGAGCAAGGTTTATaa gcttatcgataaccgtcg	
		N2 gDNA	cgacggtatcgataagcttATAACCTT GCTCTCTACCAC	
			gctgcaggaattcgatcCCAACACCA ATACTGAGCAG	
<i>pezo-1(RNAi)</i>		L4440	GGATTCGAGAAATGCGATGATcg aattcatcgatgatcagatctg	N/A
			GCATTTGGATCAGATGGTATGA CTAtggatccaccggttccatgg	
		N2 gDNA	ccatggaaccggtgatccaTAGTCATA CCATCTGATCCAAATGC	
			gatctgatcatcgatgaattcgATCATC GCATTTCTCGAATCCTG	
<i>pmk-1(RNAi)</i>		L4440	ccatggaaccggtgatccaTGCTGCT GAATGTACTCGC	N/A
			gatctgatcatcgatgaattcgGATCAG ATCCAGGGAACAATG	
		N2 gDNA	CATTGTTCCCTGGATCTGATCcg aattcatcgatgatcagatctgc	
			GAGCGAGTACATTGAGCAGCAtg gatccaccggttccatgg	

<i>pmk-3(RNAi)</i>		L4440	catggaaccggtggatccaATTATACAT CGTGACTTGAAACC	N/A
			ctgatatcatgatgaattcgCTCTCCAC TCGAATCTTGTTTC	
		N2 gDNA	GAACAAGATTTCGAGTGGAGAGc gaattcatgatgatatcagatctg	
			GGTTTCAAGTCACGATGTATAAT tggatccaccggtccatg	
pCLT14	<i>Pfos-1a::GFP::SEK-1(+)</i>	pXA9	GGCGGTACCGGTAGAAAAAATG AGTAAAGGAGAAGAACTTTTCA CTG	50 ng/μl
			GCTAGAAATGACTAGAGTTGGG CGACCTGCAGGCATGCAAG	
		pLDY-1 (Robinson-Thiewes, Dufour, Martel <i>et al.</i> , 2021)	CTTGCGATGCCTGCAGGTCGCCC AACTCTAGTCATTTTC	
			CAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTA CTCATTTTTTCTACCGGTACCGC C	

Table S4: Strains, alleles, transgenes and rearrangements used in this work.

Related to material and methods

Strain	Genotype	Source
N2	Bristol wild type isolate	CGC
AU1	<i>sek-1(ag1) X</i>	Kim, Feinbaum <i>et al.</i> , 2002
AU3	<i>nsy-1(ag3) II</i>	Kim, Feinbaum <i>et al.</i> , 2002
CB1370	<i>daf-2(e1370) III</i>	CGC
DV3327	<i>pmk-1(re170[pmk-1::mNG::3xFlag]) IV</i>	Shin <i>et al.</i> , 2018
IG544	<i>nipi-3(fr4) X</i>	Pujol <i>et al.</i> , 2008
JK560	<i>fog-1(q253) I</i>	Barton and Kimble, 1990
KU25	<i>pmk-1(km25) IV</i>	Mizuno <i>et al.</i> , 2004
RB2145	<i>tir-1(ok2859) III</i>	CGC
UM434	<i>mpk-1(ga117)/qC1[dpy-19(e1259) glp-1(q339) qls26[rol-6(su1006)gf; Plag-2::GFP] III</i>	Robinson-Thiewes, Dufour, Martel <i>et al.</i> , 2021
UTR19	<i>cpSi42[Pmex-5::mNeonGreen::PLCδ-PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)] II; oma-1(zu405te33)/nT1 [qls51] IV; oma-2(te51)/nT1 V</i>	This study
UTR21	<i>cpSi42[Pmex-5::mNeonGreen::PLCδ-PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)] II; tir-1(nar65) aak-1(nar4) III; oma-1(zu405te33)/nT1 [qls51] IV; oma-2(te51)/nT1 V;</i>	This study
UTR22	<i>cpSi42[Pmex-5::mNeonGreen::PLCδ-PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)] II; aak-1(nar5) III; oma-1(zu405te33)/nT1 [qls51] IV; oma-2(te51)/nT1 V</i>	This study
UTR212	<i>cpSi42[Pmex-5::mNeonGreen::PLCδ-PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)] II; aak-1(nar38) III; oma-1(zu405te33)/nT1 [qls51] IV; oma-2(te51)/nT1 V</i>	This study
UTR221	<i>cpSi42[Pmex-5::mNeonGreen::PLCδ-PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)] II; tir-1(nar42) III; oma-1(zu405te33)/nT1 [qls51] IV; oma-2(te51)/nT1 V</i>	This study
UTR295	<i>cpSi42[Pmex-5::mNeonGreen::PLCδ-PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)] II; aak-1(nar5) III; oma-1(zu405te33)/nT1 [qls51] IV; oma-2(te51)/nT1 V; narEx119[pXA1(Psur-5::GFP::AAK-1A cDNA; myo-3p::mCherry]</i>	This study

UTR297	<i>cpSi42[Pmex-5::mNeonGreen::PLCδ-PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)] II; tir-1(ok2859) III; oma-1(zu405te33)/nT1 [qls51] IV; oma-2(te51)/nT1 V</i>	This study
UTR299	<i>cpSi42[Pmex-5::mNeonGreen::PLCδ-PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)] II; aak-1(nar38) III; oma-1(zu405te33)/nT1 [qls51] IV; oma-2(te51)/nT1 V; narEx118[pXA1(Psur-5::GFP::AAK-1A cDNA; myo-3p::mCherry]</i>	This study
UTR348	<i>fog-1(q253) I; tir-1(ok2859) III</i>	This study
UTR351	<i>cpSi42[Pmex-5::mNeonGreen::PLCδ-PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)] II; tir-1(qd4) III; oma-1(zu405te33)/nT1 [qls51] IV; oma-2(te51)/nT1 V</i>	This study
UTR362	<i>fog-1(q253) I; pmk-1(km25) IV</i>	This study
UTR377	<i>tir-1(nar52[tir-1::mNG::3xFlag]) III</i>	This study
UTR378	<i>tir-1(nar53[tir-1::mNG::3xFlag]) III</i>	This study
UTR379	<i>tir-1(nar54[tir-1::mNG::3xFlag]) III</i>	This study
UTR410	<i>oma-1(zu405te33)/nT1 [qls51] IV; oma-2(te51)/nT1 V</i>	This study
UTR417	<i>fog-1(q253) I; sek-1(ag1) X</i>	This study
UTR418	<i>fog-1(q253) I; nsy-1(ag3) II</i>	This study
UTR422	<i>tir-1(ok2859) III; oma-1(zu405te33)/nT1 [qls51] IV; oma-2(te51)/nT1 V</i>	This study
UTR446	<i>cpSi42[Pmex-5::mNeonGreen::PLCδ-PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)] II; oma-1(zu405te33)/nT1 [qls51] IV; oma-2(te51)/nT1 V; sek-1(ag1) X</i>	This study
UTR474	<i>mpk-1(ga117)/qC1[dpy-19(e1259) glp-1(q339) qls26[rol-6(su1006)gf; Plag-2::GFP]] III; sek-1(ag1) X</i>	This study
UTR480	<i>fog-1(q253) I; nipi-3(fr4) X</i>	This study
UTR491	<i>daf-2(e1370) III; sek-1(ag1) X</i>	This study
UTR522	<i>cpSi20[Pmex-5::TAGRFPT::PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)] II; unc-119(ed3) III; narEx110[Plim-7::BFP; Pmyo-2::GFP]</i>	Turmel-Couture <i>et al.</i> , 2024
UTR527	<i>fog-1(q253) I; sek-1(km4) X</i>	This study
UTR528	<i>fog-1(q253) I; tir-1(ok2859) III; nipi-3(fr4) X</i>	This study
UTR533	<i>fog-1(q253) I; cpSi20[Pmex-5::TAGRFPT::PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)] II; unc-119(ed3) III; narEx110[Plim-7::BFP; Pmyo-2::GFP]</i>	This study
UTR537	<i>fog-1(q253) I; sek-1(km4) X; qdEx4[ges-1p::sek-1(cDNA)::GFP::unc-54-3' UTR + myo-2p::mStrawberry::unc-54-3' UTR]</i>	This study
UTR538	<i>fog-1(q253) I; sek-1(km4) X; qdEx8[unc-119p::sek-1(cDNA)::GFP::unc-54-3' UTR + myo-2p::mStrawberry::unc-54-3' UTR]</i>	This study
UTR570	<i>fog-1(q253) I; sek-1(km4) X; narEx131[pXA9(Plim7::GFP::sek-1; myo-3p::mCherry]</i>	This study

UTR571	<i>fog-1(q253) I; sek-1(km4) X; narEx132[pXA9(Plim7::GFP::sek-1; myo-3p::mCherry]</i>	This study
UTR621	<i>pmk-1(re170[pmk-1::mNG::3xFlag]) IV; fog-2(oz40) V</i>	This study
UTR732	<i>fog-1(q253) I; sek-1(km4) X; narEx154[Pfos-1::gfp::sek-1; Pmyo-3::mCherry]</i>	This study
UTR733	<i>fog-1(q253) I; sek-1(km4) X; narEx155[Pfos-1::gfp::sek-1; Pmyo-3::mCherry]</i>	This study

À l'issue de ce premier travail, plusieurs questions restaient en suspens. Quel signal pourrait être à l'origine de l'inhibition de la MPK-1 intestinale ? En outre, est-ce que d'autres modules connus dans la réponse aux stress pourraient être requis pour empêcher la suraccumulation de cellules germinales différenciées, et favoriser la mise en quiescence homéostatique des CSG ?

Fait intéressant, un crible double hybride a mis en évidence que TIR-1 interagit physiquement avec KGB-1/MAPK10, une autre MAPK appartenant à la signalisation conservée JNK, également impliquée dans la réponse à différents stress (Li *et al*, 2004). De surcroît, un des 9 candidats de notre crible génétique « sens » est porteur d'une mutation perte-de-fonction putative de MLK-1/MAP3K9 à 11, la MAP3K JNK en amont de MEK-1/MAP2K7 et KGB-1, 2/MAPK10, 9. J'ai donc décidé d'investiguer si la signalisation *kgb-1/jnk* est requise dans la mise en quiescence homéostatique des CSG.

CHAPITRE III

JNK MAPK regulates germline proliferative homeostasis in *C. elegans*

Authors

Alexandre Clouet, Yassir Haoubi and Patrick Narbonne

En préparation

Affiliations

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

Groupe de Recherche en Signalisation Cellulaire, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC G8Z 4M3, Canada

Corresponding author's email address

patrick.narbonne@uqtr.ca

Author contributions

Conceptualization: AC, PN

Methodology: AC, PN

Validation: AC

Formal Analysis: AC

Investigation: AC (epifluorescence acquisitions; genetic crosses; MLK-1 conserved domain annotation; MLK-1 homologs alignment; *jkk-1* and *mlk-1* RNAi design; RNAi construction; immuno and DAPI staining), YA (*jnk-1*, *mek-1* and *mkk-4* RNAi design), PN (*mlk-1(nar40)* isolation)

Resources: PN

Writing – Original Draft: AC

Writing – Review and Editing: AC, PN

Funding acquisition: PN

Summary

Stem cell underproliferation leads to suboptimal tissue function, while overproliferation favors benign tumor development, which can further evolve towards cancer. Stem and progenitor cell proliferation is thus usually coupled to the need for their differentiated cellular progenies by locally acting homeostatic signaling mechanisms. In well-fed *C. elegans* hermaphrodites, germline stem cell (GSC) proliferation, and downstream differentiated oocyte production, are linked to sperm availability. We previously developed a forward genetic screen to identify crucial effectors responsible for germline homeostasis. We implicated the stress-activated *pmk-1/p38* signaling that promotes homeostatic downregulation of GSC proliferation and prevents benign differentiated tumor formation in oocyte maturation incompetent (Oma) and feminized genetic backgrounds. However, it remains unclear whether other stress-activated signaling pathways could be involved in *C. elegans*' GSC regulation. Here, we highlight another candidate from our screen, in which a putative loss-of-function mutation in the conserved kinase domain of the JNK MAP3K MLK-1 is correlated to a severe and fully penetrant differentiated benign tumor phenotype. We report that RNAi-mediated downregulation of *mlk-1*, as well as downstream JNK MAP2K and MAPK, *mek-1* and *kgb-1, 2* respectively, led to differentiated germ cell overaccumulation in an Oma background, and thus phenocopied our candidate. Moreover, *kgb-1, 2* genetic loss-of-function also impaired GSC's homeostatic quiescence establishment in a feminized background. Such stress-activated signaling modules could also prevent tumorigenesis in other organisms, including humans.

Keywords

Benign tumor, *C. elegans*, germline stem cell, KGB-1, 2/MAPK10, 9, proliferation, stress

Introduction

Multicellular organisms' tissues and organs are populated by differentiated cells required for their optimal function. These specialized cells are generated throughout development and adulthood by the differentiation of progenitors or precursors originating from the division of stem cells (SCs). Tissue-resident SC's immature states are maintained by signals originating from their micro-environment, the so-called niche. SC proliferation rates are in turn regulated by systemic factors including hormones and growth factors. As the demand for differentiated cells varies depending on tissues (Tomasetti *et al.*, 2017; Tomasetti & Vogelstein, 2015), SC proliferation rates are further regulated at a tissue-specific scale by homeostatic mechanisms. Homeostatic regulation of SC proliferation is a widely spread phenomenon, occurring in most organisms and SC systems, where it effectively prevents the formation of benign differentiated tumors (Valet & Narbonne, 2022). As a lower-than-normal SC proliferation rate can lead to incomplete organ formation, a higher-than-normal rate comes with increased chances for DNA replication and segregation errors to occur, which in turn predispose to cancer through the accumulation of inherited genetic and epigenetic changes (Tomasetti *et al.*, 2017; Tomasetti & Vogelstein, 2015); it is therefore crucial for SC homeostasis to be finely controlled.

Several examples of homeostatic regulatory loops have been found in vertebrate and invertebrate SC systems. In mice hair follicles, the accumulating differentiated progeny releases FGF18 and BMP6 to promote bulge SC quiescence (Hsu *et al.*, 2011). In the *Drosophila* larvae hematopoietic organ, the niche initiates a multi-tissue homeostatic mechanism by secreting Pvf1, a signal that is integrated by differentiated hemocytes, which in turn release adenosine deaminase Adgf-A to inhibit adenosine's mitogenic function by converting it into inosine (Mondal *et al.*,

2011). In the adult *Drosophila* midgut, wounding, infection or stress-mediated release of cytokines by enterocytes promotes gut SC proliferation through the Jak/Stat signaling (Jiang *et al.*, 2009).

Another example of SC homeostasis regulation has been found in *C. elegans* hermaphrodites. During the L4 larval stage, the germline undergoes a transient spermatogenesis phase generating a limited number of spermatozoa that are stored in spermathecae. In adults, the germline SC (GSC) differentiation program irremediably switches to oogenesis. In close cooperation with the somatic gonad, oocytes are continually matured, ovulated and fertilized until spermatozoa stocks are emptied (Greenstein, 2005; Hubbard & Greenstein, 2005). In this situation, diakinesis-staged oocytes accumulate in the proximal gonad and a homeostatic mechanism inhibits GSC proliferation to prevent oocyte overaccumulation (Cinquin *et al.*, 2016; Narbonne *et al.*, 2015, 2017).

Mutations that prevent spermatogenesis (i. e. *fog* and *fem* mutants) (Barton & Kimble, 1990; Kimble *et al.*, 1984) triggers a germline homeostasis feedback in young adults. This process can be suppressed upon mating with a male (Narbonne *et al.*, 2015), showing that homeostatic suppression of GSC proliferation is reversible. Homeostatic GSC quiescence establishment is also irreversibly triggered in oocyte maturation defective *oma-1*; *oma-2* double mutants in which sperm is present, but oocytes are maturation incompetent (Detwiler *et al.*, 2001; Narbonne *et al.*, 2017). In the *oma-1,2* double mutants further defective for germline homeostasis signaling, differentiated oocytes keep accumulating, thus leading to the formation of a benign tumor constituted of differentiated cells, a phenotype that we qualified as Germline homeostasis defective (Ghd) (Clouet *et al.*, 2025; Narbonne *et al.*, 2015, 2017; Valet & Narbonne, 2022).

A gain-of-function in *C. elegans*' Rat sarcoma (Ras) ortholog *let-60* prevents the homeostatic establishment of GSC quiescence (Narbonne *et al.*, 2017), while *let-60* is an activator of the extracellular regulated kinase's (ERK's) ortholog MPK-1 mitogen activated protein kinase

(MAPK) signaling, a positive regulator of GSC proliferation. MPK-1/ERK signaling is required for homeostatic inhibition of GSC proliferation cell non-autonomously, as a transgenic rescue of the soma-specific MPK-1A isoform restores GSC proliferation in *mpk-1(ø)* mutants (Robinson-Thiewes *et al.*, 2021).

In previous studies, we implicated critical effectors of germline homeostasis, including the *C. elegans* orthologs of the liver kinase B1 (LKB1), the AMP-activated protein kinase α 2 catalytic subunit (PRKAA2), the phosphatase and tensin homolog (PTEN), and 14-3-3: PAR-4, AAK-1, DAF-18 and PAR-5, respectively. Depletion of any of these proteins disrupt germline homeostasis and prevents the downregulation of GSC proliferation in the absence of sperm (Narbonne *et al.*, 2017). In these spermless homeostasis-defective double mutants, GSC proliferation and oocyte production proceed at a fast pace, as in the wild-type, while oocytes spontaneously mature, are ovulated and laid as endomitotic oocytes.

Furthermore, a forward genetic screen strategy implicated the *C. elegans* orthologs of Sterile Alpha and TIR motif containing 1 (SARM1), Tribbles1 and a conserved mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5/6/15 (MAP3K5/6/15), MAP2K3/6 and p38 MAPK signaling module, TIR-1, NIPI-3, NSY-1, SEK-1 and PMK-1, respectively, in germline homeostasis. The identification of this stress-activated module along with the well-characterized implication of AAK-1 suggests that stress regulation plays a role in germline homeostasis and associated inhibition of proliferation.

Here, we investigated another Ghd candidate from our screen, in which a putative loss-of-function mutation affects the ortholog of MAP3K9-11, MLK-1, the MAP3K upstream the MEK-1/MAP2K7 → KGB-1/MAPK10 JNK MAPK signaling module. Interestingly, knock-down of MEK-1 or KGB-1 also led to differentiated germ cells overaccumulation in an *oma-1, 2* genetic

background, and genetic loss-of-function of *kgb-1* impairs establishment of GSC quiescence in a feminized background.

Results

The JNK MAP3K MLK-1 prevents differentiated germ cells overaccumulation

In order to identify new signaling modules required for germline homeostasis regulation, we came back to the Ghd candidate obtained in our EMS mutagenesis screen (Clouet *et al.*, 2025). One such candidate displayed a fully penetrant Ghd-like phenotype (Fig. 1A-B). Among the EMS-generated variations was a missense (S381L) in the sequence coding for the kinase domain of *mlk-1*, the MAP3K of the conserved JNK MAPK (Fig. 1C). As the substitution touches a well-conserved residue in a highly conserved region, we reasoned that it would likely interfere with MLK-1 function (Fig. 1D).

Similar to AMPK and p38 MAPK, JNK MAPK is required for the response to various stresses, including pathogens, heavy metals, axon injury and ROS (Kim *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2018; Mizuno *et al.*, 2004; Nix *et al.*, 2011; Pastuhov *et al.*, 2012; Runkel *et al.*, 2013). JNK signaling also plays a role in ageing and fertility in non-stressful conditions (Orsborn *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2002; Twumasi-Boateng *et al.*, 2012). Interestingly, a yeast two-hybrid screen also highlighted the physical interaction of KGB-1, the JNK MAPK downstream MLK-1, with TIR-1 (Li *et al.*, 2004).

Thus, we decided to use RNAi-mediated knock-down of *mlk-1* to see whether it would cause a Ghd phenotype. Interestingly, *mlk-1(RNAi)* induced a fully penetrant Ghd-like phenotype (Fig 1. E-F). We thus asked whether depletion of other JNK MAPK kinases would phenocopy the loss of *mlk-1*. Among these, reduction of *mek-1* and *kgb-1/2* (but not of *jkk-1* and *jnk-1*) led to

differentiated germ cells overaccumulation, albeit not as severe in the case of *kgb-1/2* (Table 1, Fig. 2A-C). There was a high sequence identity between the RNAi we used and the cDNA sequences of *kgb-1* and *kgb-2*, which could have led to a suboptimal decrease in both genes' expression. Nevertheless, genetic depletion of both *kgb-1, 2* simultaneously in a feminized background was sufficient to disrupt GSC quiescence establishment, in the same way as a *fog-1; aak-1* feminized double (Fig. 3A-B).

Discussion

Homologues of JNK MAPK signaling play an ambivalent role in the regulation of cell proliferation, while both proto-oncogene and tumor-suppressing functions have been reported in the literature. For instance, MLK-1's and KGB-1's *Drosophila* homologues, *Hemipterous* and *Basket* respectively, promote follicle cells proliferation before their transition to endocycle (Jordan *et al.*, 2006). Moreover, RNAi-mediated knock-down of KGB-1's homolog, MAPK10, leads to a decreased pancreatic β cell proliferation in newborn mice (Tenenbaum *et al.*, 2021). Other studies emphasize tumor-suppressive roles for JNK MAPK effectors. In fact, MEK-1's human homologue, MAP2K7, stabilizes p53 in lung and breast cancers (Schramek *et al.*, 2011). Our results suggest that the stress-activated MLK-1/MAP3K9-11 $\rightarrow$ MEK-1/MAP2K7 $\rightarrow$ KGB-1, 2/MAPK10, 9 signaling prevents differentiated germ cells overaccumulation downstream oocyte accumulation in the *oma-1, 2* genetic background. Furthermore, genetic loss-of-function of *kgb-1, 2* was sufficient to prevent GSC quiescence establishment in a feminized background. Both these results support a conserved tumor-suppressive roles for *kgb-1/jnk* signaling homologues. To our knowledge, this is also the first piece of evidence towards a conserved tumor-suppressive role for MLK-1/MAP3K9-11 and MEK-1/MAP2K7.

A prior study has generated KGB-1 a reporter transgene by driving the expression of GFP downstream of *kgb-1*'s endogenous promoter, and visualized a strong expression during embryogenesis, larval development and adulthood. Such expression was observed in the nervous system, pharynx, intestine, excretory system, longitudinal muscles and gonads, although this study did not differentiate the germline from the somatic gonad (Gerke *et al.*, 2014). Based on this, we formulate three conjectures related to *kgb-1/jnk* signaling's spatial requirement in preventing differentiated germ cells overaccumulation downstream oocyte accumulation in *C. elegans* hermaphrodites. Firstly, this pathway could be required in the gonadal sheath cells, in the same way as *pmk-1/p38* signaling, leading to gonadal sheath's MPK-1 inhibition (Clouet *et al.*, 2025). Secondly, *kgb-1/jnk* signaling could be required in the intestine, as we did not identify the homeostatic signal responsible for intestinal MPK-1's repression. Thirdly, *kgb-1/jnk* could be required cell-autonomously in the germline. In fact, previous study has shown that KGB-1 is responsible for the degradation of a P granule component, GLH-1, through the direct phosphorylation of a phosphodegron motive (Orsborn *et al.*, 2007). Interestingly, both *glh-1(RNAi)* and *kgb-1(RNAi)* induced a severe sterility phenotype, while they led to a decreased or increased germ cells number, respectively (Kuznicki *et al.*, 2000). Thus, differentiated germ cells overaccumulation observed following the downregulation of a *kgb-1/jnk* signaling component in the *oma-1, 2* genetic background could be due to a defect in a P granule component post-translational regulation, and not to a defect in germline homeostasis signaling leading to the inhibition of somatic MPK-1 and downstream GSC proliferation.

To our surprise, reduction or loss of a *pmk-1/p38* or *kgb-1, 2/JNK* effector led to differentiated germ cells overaccumulation in an *oma-1, 2* genetic background, suggesting that both modules either act in the same molecular cascade, or that they regulate two distinct non-redundant molecular processes. If conserved, deciphering this complex germline regulatory network could

help understanding the process behind the formation of differentiated benign tumors, which, in turn could further evolve towards carcinogenesis.

Acknowledgments

We thank Dr Monique Zetka for reagents. Some strains were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). We are thankful to the *C. elegans* gene knockout consortium and to WormBase (part of the Alliance of genome resources) for their essential roles in *C. elegans* research. Research in the Narbonne laboratory is funded by grants from the NSERC (RGPIN-2019-06863, RGPAS-2019-00017, DGEER-2019-00326), the CIHR (PJT-169138), and a Research Chair from the *Fondation Marcel et Rolande Gosselin* to PN. PN is a junior 2 FRQS bursary scholar (310643).

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

Material and methods

Key resources table

Reagent or Resource	Source	Identifier
Antibodies		
Mouse anti-pH3 (monoclonal)	Cell Signaling	Cat# 9706; RRID:AB_331748
Rabbit anti-WAPL-1 (polyclonal)	Novus Biologicals	Cat# 49300002; RRID:AB_10718903
Rabbit anti-HIM-3 (polyclonal)	Dr Monique Zetka	N/A

A488-conjugated goat anti-mouse (monoclonal)	Invitrogen	Cat# A-11029; RRID:AB138404
A546-conjugated goat anti-rabbit (monoclonal)	Invitrogen	Cat# A-11035; RRID:AB143051
Chemicals and enzymes		
Carbenicillin, disodium salt	Bioshop	CAR666.5
Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Bioshop	IPT002.50
Duolink <i>in situ</i> mounting medium with DAPI	Sigma-Aldrich	DUO82040
Hygromycin B, sterile liquid in PBS	Bioshop	HYG002
Tetramisole hydrochloride	Sigma-Aldrich	L9756
Organisms/strains		
<i>C. elegans</i> strains	See table S2	N/A
<i>Escherichia coli</i> : OP50	CGC	N/A
<i>Escherichia coli</i> : HT115	CGC	N/A
Oligonucleotides		
Oligonucleotides	See Table S1	N/A
Softwares		
Graphpad Prism 8.0.2	graphpad.com	N/A
Zeiss Zen 2.6	zeiss.com	N/A
ImageJ	imagej.net	N/A
Snapgene 5.0.8	snapgene.com	N/A

Experimental model

C. elegans were cultured following standard procedures as previously described, on Nematode Growth Medium (NGM) seeded with *Escherichia coli* OP50 at 15°C, unless otherwise

indicated. The Bristol isolate N2 was used as the wild-type control throughout (Brenner, 1974). All alleles, transgenes and rearrangements used in this study are listed in Table S2.

Method details

RNA interference

RNAi screens were conducted as previously described (Fraser *et al.*, 2000). In short, heterozygous *oma-1/nT1*; *oma-2/nT1* P0s were upshifted at L4 stage from 15°C to 25°C on NGM plates supplemented with 25µg/ml carbenicillin and 1mM IPTG, seeded with *E. coli* HT115 containing either an empty L4440 vector, or the same vector in which an exon-rich DNA sequence has been cloned to permit the expression of a dsRNA targeting a gene of interest. The *oma-1*; *oma-2* homozygous (*nT1* less) F1s were isolated on a new similarly seeded RNAi plate at L4 stage and were allowed to grow for an additional 72h at 25°C before being scored for differentiated germ cell overaccumulation (Clouet *et al.*, 2025). RNAi constructs were recovered from the Ahringer library (Fraser *et al.*, 2000), except for the *jkk-1*, *jnk-1*, *mek-1*; *mkk-4* and *mlk-1* constructs that were generated in house as described below. All clones were validated by Sanger sequencing.

Sequence alignment

Protein sequences were obtained from Wormbase (Sternberg *et al.*, 2024). Protein alignments were conducted on SnapGene 5.0.8 using the Clustal Omega algorithm (Sievers *et al.*, 2011). Conserved domains were obtained from UniprotKB's protein annotation (UniProt, 2025).

GSC MI quantification

GSC MI was quantified as previously described (Narbonne *et al.*, 2015) except that since we used a *fog-1(q253)* thermosensitive allele, P0 adults were upshifted from 15°C to 25°C to

prevent spermatogenesis in the resulting F1 progeny. F1s were then picked at late L4 stage, based on vulva development (Seydoux *et al.*, 1993), and transferred to a new plate where they were allowed to grow for an additional 24 hours. Resulting adult day 1 (A1) individuals were harvested and dissected as previously described (Narbonne *et al.*, 2017), in a drop of PBS on a coverslip, which was flipped against a microscope slide coated with poly-L-lysine and submitted to a -80°C freeze-crack procedure. Picking and dissections were always completed within 5 minutes (Lee *et al.*, 2007).

Frozen gonads were fixed in -20°C methanol for 1 minute and post-fixed in a 3.7% paraformaldehyde PBST (1x PBS + 0.1% Tween 20) solution for 30 minutes at room temperature. Following 1 PBST rinse and 3 10-minutes PBST washes, samples were incubated at room temperature in a 3% bovine serum albumin (BSA) PBST solution for 1 hour. The blocking solution was then removed, and samples were incubated at 4°C in a 1% BSA PBST primary antibody solution overnight. To label the PZ, anti-WAPL-1 (Crawley *et al.*, 2016; Kocsisova *et al.*, 2018) or anti-HIM-3 (Zetka *et al.*, 1999) antibodies (1:500 each) were used, while anti-phospho[S10]-histone H3 antibodies were used to label M-phase cells (Sauve *et al.*, 1999) (1:250). Following 1 PBST rinse and 3 10-minutes PBST washes, gonads were incubated in the dark at room temperature in a 1% BSA goat-anti-rabbit alexa546 (1:500) and goat-anti-mouse alexa488 (1:500) PBST secondary antibodies solution for 90 minutes. After 1 PBST rinse and 2 10-minutes PBST washes, samples were incubated in the dark at room temperature in a 1µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) PBS solution for 7 minutes. After a PBST rinse and a final 10-minute PBST wash, gonads were mounted in 8µl Duolink *in situ* mounting medium, sealed with nail polish, and stored at -20°C until imaged. The counting of PZ germ nuclei was partially automated as described (Korta *et al.*, 2012), using an ImageJ plugin developed by Dr Jane Hubbard's laboratory (Korta *et al.*, 2012).

Diakinesis oocyte quantification

A1-staged 25°C-raised F1s were generated as above, fixed in Carnoy's solution and stained with DAPI as previously described (Narbonne & Roy, 2006). After the removal of the fixative and 3 5-minute PBST washes, samples were incubated in the dark at room temperature in a 0.1 mg/ml DAPI PBS solution for 30 minutes. After a final 5-minute PBST wash, samples were mounted in 3µl Duolink *in situ* mounting medium, sealed with nail polish and stored at -20°C until imaged. The number of diakinesis oocytes, having at least one bivalent condensed chromosome (Labella *et al.*, 2011), per gonad arm was then quantified.

Image acquisition and processing

Image acquisition and post-acquisition processing were conducted as previously described (Clouet *et al.*, 2025).

For live epifluorescence imaging (Figures 1A-B, 1E-F, 2A-C), nematodes were soaked in a 0.1% tetramisole M9 paralyzing solution drop on a cover slip, and flipped onto a 3% agarose M9 pad placed on a microscope slide. Images were acquired on an inverted Zeiss Axio Observer.Z1 with a 20x/0.8 numerical aperture dry objective using a 1 µm z-step. Samples were excited by a LED module at 488nm (50% intensity, 100ms exposure) and emission was collected at 500-550nm. Images were then stitched using the Zen 2.6 software. Brightness/contrast were uniformly adjusted, and animals were computationally straightened using the ImageJ software for display purposes. All displayed live epifluorescence micrographs show single focal planes.

Plasmid construction, transgenesis and CRISPR-Cas9-mediated genome edition

We used the Gibson method (Gibson *et al.*, 2009) for all constructs assembly. The source DNA and primers used to generate all constructs, as well as their microinjection concentrations,

are reported in Table S1. Extra-chromosomal arrays were generated as previously described (Mello *et al.*, 1991) by regular plasmid DNA microinjections at a total concentration of 200 µg/ml using a pKSII as a filler DNA and pCFJ104[*Pmyo-3::mCherry*] (Frokjaer-Jensen *et al.*, 2008) (5 µg/ml) as a co-injection marker.

Quantification and statistical analyses

Statistical analyses were performed, and graphs were generated using GraphPad Prism 8.0.2. For each dataset, the Shapiro-Wilk normality test was used to determine whether it followed a Gaussian distribution. Homoscedasticity was then verified either with an F test (2-samples comparisons), or with the Brown-Forsythe test (>2-samples comparisons).

All presented datasets are the combination of ≥ 2 independent biological replicates.

Table 1: RNAi screen of JNK MAP kinases in the *oma-1, 2* background

RNAi-targeted gene	Human homolog(s)	Differentiated germ cells hyperaccumulation*
<i>jkk-1</i>	MAP2K7	-
<i>jnk-1</i>	MAPK8/9/10	-
<i>kgb-1 (kgb-2)</i>	MAPK10 (MAPK9)	+
<i>mek-1</i>	MAP2K7	+
<i>mlk-1</i>	MAP3K9/10/11/21	+

*When targeted by RNAi in the *oma-1; oma-2* genetic background.

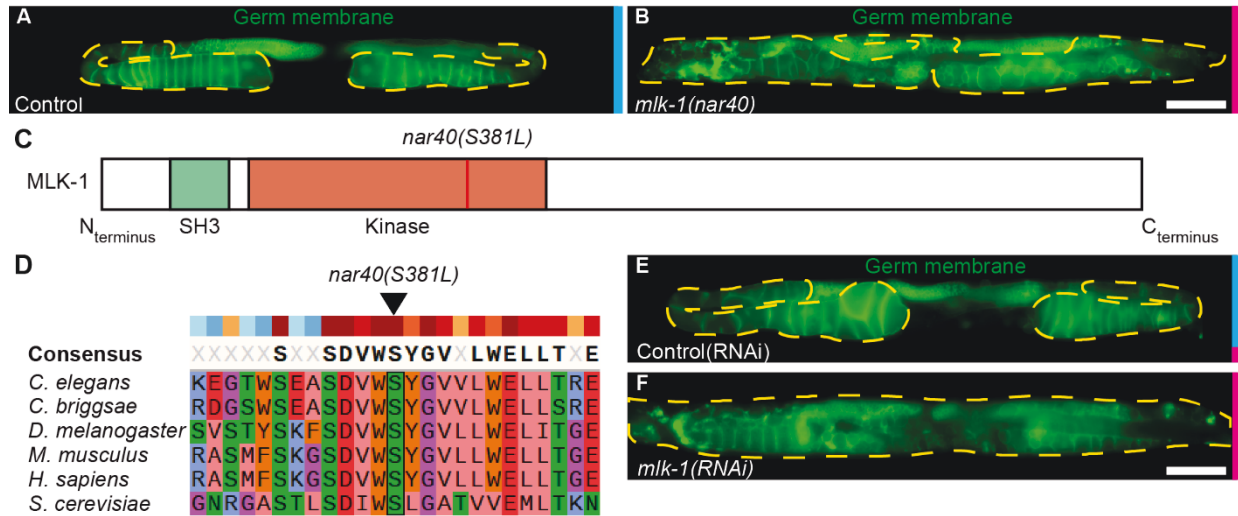


Figure 1. MLK-1 prevents the formation of differentiated germline tumors. (A-B) Representative epifluorescence micrographs of A3 hermaphrodites (20°C) of the indicated genotypes, all in the *oma-1; oma-2* background (sample sizes: 14-13). Germ membranes are marked in green by *cpSi42*. Yellow dashed lines delineate area occupied by oocytes. Anterior, left; dorsal, up. Scale bar, 100µm. A quantification of the phenotype's penetrance is shown as a colored vertical bar on the right (Blue, Oma; Red, Ghd). All strains contain *cpSi42[Pmex-5::mNG::PLCδ-PH::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)]*, *oma-1(zu405te33)*, and *oma-2(te51)*. (C) Schematic representation of MLK-1's conserved functional domains. Red vertical bar, EMS-generated allele. (D) Clustal Omega alignments of MLK-1 orthologs showing a high evolutionary conservation around the *nar40* missense allele. (E-F) Representative epifluorescence micrographs of A3 hermaphrodites (25°C) of the indicated genotypes, all in the *oma-1; oma-2* background (sample sizes: 37-25). Germ membranes are marked in green by *cpSi42*. Presented as in (A-B).

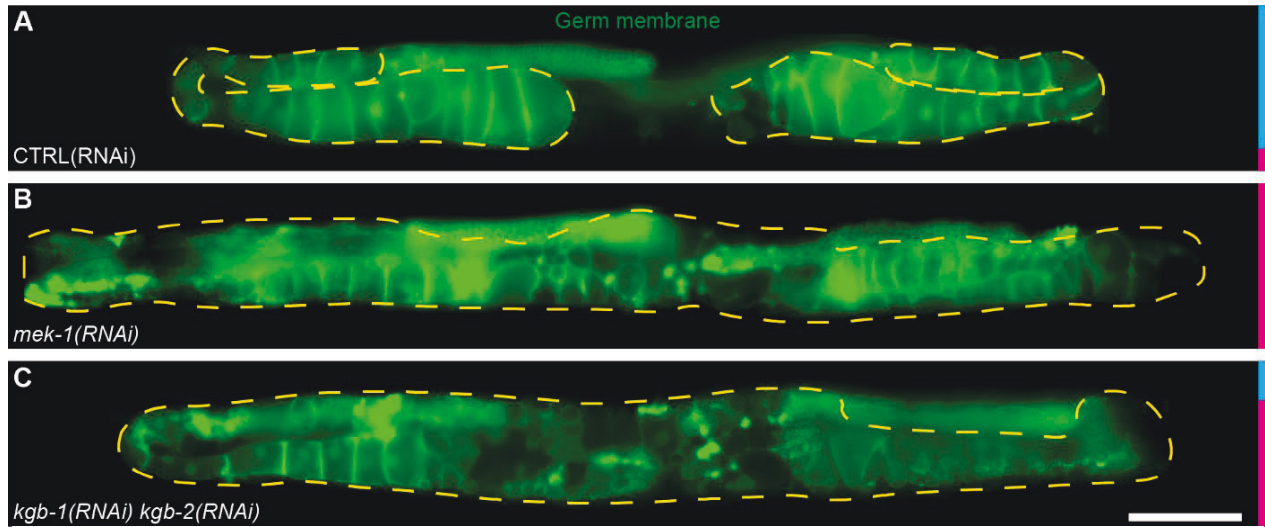


Figure 2. MEK-1 and KGB-1/2 prevent the formation of differentiated germline tumors. (A-C) Representative epifluorescence micrographs of A3 hermaphrodites (25°C) of the indicated genotypes, all in the *oma-1*; *oma-2* background (sample sizes: 37-28-19). Germ membranes are marked in green by *cpSi42*. Yellow dashed lines delineate area occupied by oocytes. Anterior, left; dorsal, up. Scale bar, 100µm. A quantification of the phenotype's penetrance is shown as a colored vertical bar on the right (Blue, Oma; Red, Ghd). All strains contain *cpSi42*[*Pmex-5::mNG::PLCδ-PH::tbb-2* 3'UTR + *unc-119*(+)], *oma-1*(*zu405te33*), and *oma-2*(*te51*).

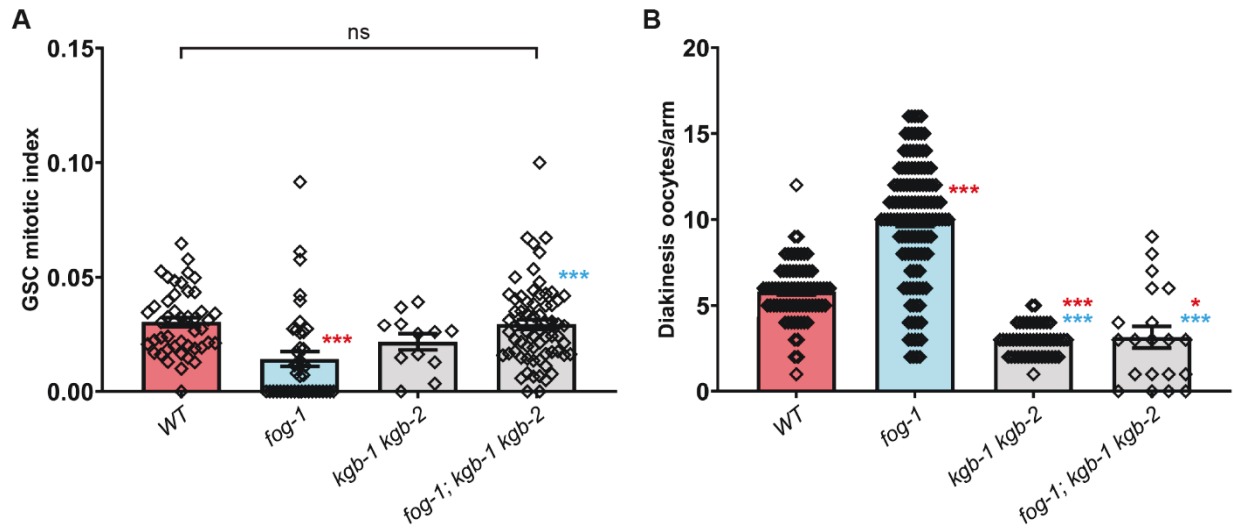


Figure 3. KGB-1/2 is required to suppress GSC proliferation in the absence of sperm. (A) Average GSC MIs for each of the indicated genotype (sample sizes: 45-41-12-67). (B) Average diakinesis oocyte per gonad arm for each of the indicated genotype (sample sizes: 76-134-51-20). (A-B) Each bar represents the mean $\pm$ SEM, and each point represents a different gonad arm. Red asterisks show statistical significance ($p < 0.05$) vs wild-type; blue vs *fog-1* (Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparisons). Double asterisks, $p < 0.01$; triple asterisk, $p < 0.001$. Ns, not significant. Alleles: *fog-1*(*q253*), *kgb-1*(*um3*), *kgb-2*(*km16*).

References

- Barton MK, Kimble J (1990) fog-1, a regulatory gene required for specification of spermatogenesis in the germ line of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 125: 29-39
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71-94
- Cinquin A, Chiang M, Paz A, Hallman S, Yuan O, Vysniauskaite I, Fowlkes CC, Cinquin O (2016) Intermittent Stem Cell Cycling Balances Self-Renewal and Senescence of the *C. elegans* Germ Line. *PLoS Genet* 12: e1005985
- Clouet A, Valet M, Dufour B, Rieger J, Lechasseur X, Zoumabo ATC, Dzuna LVF, Murray A, Deng J, Martel P-O *et al* (2025) Non-autonomous PMK-1/p38 MAPK signaling ensures homeostatic downregulation of germline stem cell proliferation in *C. elegans*. *bioRxiv*: 2025.2009.2024.678176
- Crawley O, Barroso C, Testori S, Ferrandiz N, Silva N, Castellano-Pozo M, Jaso-Tamame AL, Martinez-Perez E (2016) Cohesin-interacting protein WAPL-1 regulates meiotic chromosome structure and cohesion by antagonizing specific cohesin complexes. *Elife* 5: e10851
- Detwiler MR, Reuben M, Li X, Rogers E, Lin R (2001) Two zinc finger proteins, OMA-1 and OMA-2, are redundantly required for oocyte maturation in *C. elegans*. *Dev Cell* 1: 187-199
- Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J (2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* 408: 325-330
- Frokjaer-Jensen C, Davis MW, Hopkins CE, Newman BJ, Thummel JM, Olesen SP, Grunnet M, Jorgensen EM (2008) Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* 40: 1375-1383
- Gerke P, Keshet A, Mertenskotter A, Paul RJ (2014) The JNK-like MAPK KGB-1 of *Caenorhabditis elegans* promotes reproduction, lifespan, and gene expressions for protein biosynthesis and germline homeostasis but interferes with hyperosmotic stress tolerance. *Cell Physiol Biochem* 34: 1951-1973
- Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, 3rd, Smith HO (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6: 343-345
- Greenstein D (2005) Control of oocyte meiotic maturation and fertilization. *WormBook*: 1-12
- Hsu YC, Pasolli HA, Fuchs E (2011) Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle. *Cell* 144: 92-105
- Hubbard EJ, Greenstein D (2005) Introduction to the germ line. *WormBook*: 1-4
- Jiang H, Patel PH, Kohlmaier A, Grenley MO, McEwen DG, Edgar BA (2009) Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut. *Cell* 137: 1343-1355
- Jordan KC, Schaeffer V, Fischer KA, Gray EE, Ruohola-Baker H (2006) Notch signaling through tramtrack bypasses the mitosis promoting activity of the JNK pathway in the mitotic-to-endocycle transition of *Drosophila* follicle cells. *BMC Dev Biol* 6: 16
- Kim DH, Liberati NT, Mizuno T, Inoue H, Hisamoto N, Matsumoto K, Ausubel FM (2004) Integration of *Caenorhabditis elegans* MAPK pathways mediating immunity and stress resistance by MEK-1 MAPK kinase and VHP-1 MAPK phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10990-10994
- Kimble J, Edgar L, Hirsh D (1984) Specification of male development in *Caenorhabditis elegans*: the fem genes. *Dev Biol* 105: 234-239
- Kocsisova Z, Mohammad A, Kornfeld K, Schedl T (2018) Cell Cycle Analysis in the *C. elegans* Germline with the Thymidine Analog EdU. *J Vis Exp*

Korta DZ, Tuck S, Hubbard EJ (2012) S6K links cell fate, cell cycle and nutrient response in *C. elegans* germline stem/progenitor cells. *Development* 139: 859-870

Kuznicki KA, Smith PA, Leung-Chiu WM, Estevez AO, Scott HC, Bennett KL (2000) Combinatorial RNA interference indicates GLH-4 can compensate for GLH-1; these two P granule components are critical for fertility in *C. elegans*. *Development* 127: 2907-2916

Labella S, Woglar A, Jantsch V, Zetka M (2011) Polo kinases establish links between meiotic chromosomes and cytoskeletal forces essential for homolog pairing. *Dev Cell* 21: 948-958

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

Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, Vidalain PO, Han JD, Chesneau A, Hao T *et al* (2004) A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* 303: 540-543

Liu L, Ruediger C, Shapira M (2018) Integration of Stress Signaling in *Caenorhabditis elegans* Through Cell-Nonautonomous Contributions of the JNK Homolog KGB-1. *Genetics* 210: 1317-1328

Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V (1991) Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* 10: 3959-3970

Mizuno T, Hisamoto N, Terada T, Kondo T, Adachi M, Nishida E, Kim DH, Ausubel FM, Matsumoto K (2004) The *Caenorhabditis elegans* MAPK phosphatase VHP-1 mediates a novel JNK-like signaling pathway in stress response. *EMBO J* 23: 2226-2234

Mondal BC, Mukherjee T, Mandal L, Evans CJ, Sinenko SA, Martinez-Agosto JA, Banerjee U (2011) Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. *Cell* 147: 1589-1600

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

Narbonne P, Maddox PS, Labbe JC (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: e1006738

Narbonne P, Roy R (2006) Inhibition of germline proliferation during *C. elegans* dauer development requires PTEN, LKB1 and AMPK signalling. *Development* 133: 611-619

Nix P, Hisamoto N, Matsumoto K, Bastiani M (2011) Axon regeneration requires coordinate activation of p38 and JNK MAPK pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 10738-10743

Orsborn AM, Li W, McEwen TJ, Mizuno T, Kuzmin E, Matsumoto K, Bennett KL (2007) GLH-1, the *C. elegans* P granule protein, is controlled by the JNK KGB-1 and by the COP9 subunit CSN-5. *Development* 134: 3383-3392

Pastuhov SI, Fujiki K, Nix P, Kanao S, Bastiani M, Matsumoto K, Hisamoto N (2012) Endocannabinoid-Gα_i signalling inhibits axon regeneration in *Caenorhabditis elegans* by antagonizing Gα_i-PKC-JNK signalling. *Nat Commun* 3: 1136

Robinson-Thiewes S, Dufour B, Martel PO, Lechasseur X, Brou AAD, Roy V, Chen Y, Kimble J, Narbonne P (2021) Non-autonomous regulation of germline stem cell proliferation by somatic MPK-1/MAPK activity in *C. elegans*. *Cell Rep* 35: 109162

Runkel ED, Liu S, Baumeister R, Schulze E (2013) Surveillance-activated defenses block the ROS-induced mitochondrial unfolded protein response. *PLoS Genet* 9: e1003346

Sauve DM, Anderson HJ, Ray JM, James WM, Roberge M (1999) Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH2-terminal domain during mitotic chromosome condensation. *J Cell Biol* 145: 225-235

Schramek D, Kotsinas A, Meixner A, Wada T, Elling U, Pospisilik JA, Neely GG, Zwick RH, Sigl V, Forni G *et al* (2011) The stress kinase MKK7 couples oncogenic stress to p53 stability and tumor suppression. *Nat Genet* 43: 212-219

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

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J *et al* (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7: 539

Smith P, Leung-Chiu WM, Montgomery R, Orsborn A, Kuznicki K, Gressman-Coberly E, Mutapcic L, Bennett K (2002) The GLH proteins, *Caenorhabditis elegans* P granule components, associate with CSN-5 and KGB-1, proteins necessary for fertility, and with ZYX-1, a predicted cytoskeletal protein. *Dev Biol* 251: 333-347

Sternberg PW, Van Auken K, Wang Q, Wright A, Yook K, Zarowiecki M, Arnaboldi V, Becerra A, Brown S, Cain S *et al* (2024) WormBase 2024: status and transitioning to Alliance infrastructure. *Genetics* 227

Tenenbaum M, Plaisance V, Boutry R, Pawlowski V, Jacovetti C, Sanchez-Parra C, Ezanno H, Bourry J, Beeler N, Pasquetti G *et al* (2021) The Map3k12 (Dlk)/JNK3 signaling pathway is required for pancreatic beta-cell proliferation during postnatal development. *Cell Mol Life Sci* 78: 287-298

Tomasetti C, Li L, Vogelstein B (2017) Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* 355: 1330-1334

Tomasetti C, Vogelstein B (2015) Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 347: 78-81

Twumasi-Boateng K, Wang TW, Tsai L, Lee KH, Salehpour A, Bhat S, Tan MW, Shapira M (2012) An age-dependent reversal in the protective capacities of JNK signaling shortens *Caenorhabditis elegans* lifespan. *Aging Cell* 11: 659-667

UniProt C (2025) UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Res* 53: D609-D617

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

Zetka MC, Kawasaki I, Strome S, Muller F (1999) Synapsis and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* require HIM-3, a meiotic chromosome core component that functions in chromosome segregation. *Genes Dev* 13: 2258-2270

Supplemental information

JNK MAPK regulates germline proliferative homeostasis in *C. elegans*

Authors

Alexandre Clouet, Yassir Haoubi and Patrick Narbonne

Table S1: Plasmid design

Name	Description	Source material	Primers (5' -> 3')	Injection concentration
<i>jkk-1(RNAi)</i>		L4440 (Dr Andrew Fire lab)	CAAACACGCCTTGTGTCAACTAAcg aattcatcgatgatcatcagatc	N/A
			GAACGTCGTATTTGGAATTCGTggat ccaccggttccatg	
		N2 gDNA	catggaaccggtggatccaACGAATTCCAA ATACGACGTTTC	
			gatctgatcatcgatgaattcgTTAGTTGAC ACAAGGCGTGTTTG	
<i>jnk-1(RNAi)</i>		L4440	CATAGTGCTGGAATTATACACAGGga tatcgaattcctgcagcc	N/A
			GTCTCGACCAGATGATGATGGAAC CAGCCAatcgataccgtcgacctcg	
		N2 gDNA	gaggtcgacggtatcgatTGGCTGGTTCCA TCATCATCTG	
			ggctgcaggaattcgatcCCTGTGTATAA TTCCAGCACTATG	
<i>mek-1(RNAi)</i>		L4440	GATTCTCAATGACGAGgatatcgaattcct gcagcccgg	N/A
			GAAGTCTCTCTCCATatcgataccgtcga cctcg	
		N2 gDNA	gaggtcgacggtatcgatATGGAGAGAGAC TTCGACCTTG	
			ggctgcaggaattcgatcCTCGTCATTGA GAATCTTGAC	
<i>mkk-4(RNAi)</i>		L4440	CGAGAGCACGACACAATTGTGgat cgaattcctgcagcc	N/A
			GTAAATTCTCGTCATCTTCTTGAAC CATatcgataccgtcgacctcg	
		N2 gDNA	cgacggtatcgatATGGTTCAAGAAGATG ACGAGAATTTACGC	

			ggctgcaggaattcgatatcACAATTGTGT CGTGCTCTCG	
<i>mlk-1(RNAi)</i>		L4440	GATGCCAATAGATTTAGTACTGCAG gatatcgaattcctgcagcccg	N/A
			GCTTCTCCCATTGACCATtgcgatac cgtcgacctcgag	
		N2 gDNA	ctcgaggtcgacggatcgatAATGGTCGAA TGGGAGAAGC	
			cgggctgcaggaattcgatatcCTGCAGTAC TAAATCTATTGGCATC	

Table S2: Strains, alleles, transgenes and rearrangements used in this work

Strain	Genotype	Source
N2	Bristol wild type isolate	CGC
JK560	<i>fog-1(q253) I</i>	Barton and Kimble, 1990
KB7	<i>kgb-1(um3) kgb-2(km16) IV</i>	Osborn <i>et al.</i> , 2007
UTR481	<i>fog-1(q253) I; kgb-1(um3) kgb-2(km16) IV</i>	This study

CHAPITRE IV

Discussion

Au cours de ma formation doctorale, j'ai mis en évidence de nouveaux acteurs de la signalisation germinale homéostatique des CSG de *C. elegans*. En effet, l'identification de TIR-1 m'a amené à impliquer le module p38 MAPK (NSY-1 → SEK-1 → PMK-1) et la pseudokinase TRIB1/NIPI-3 ainsi que le module JNK MAPK (MLK-1 → MEK-1 → KGB-1). La réduction ou la perte de fonction de l'un de ces acteurs aboutit à la formation d'une tumeur bénigne différenciée dans le fond génétique *oma-1,2*. De plus, la perte d'un effecteur du module p38 MAPK ou de KGB-1 compromet la mise en quiescence homéostatique des CSG dans le fond génétique féminisé *fog-1*. Il s'agit d'un nouveau rôle pour ces protéines chez *C. elegans*.

En outre, j'ai observé que le module p38 MAPK régule la prolifération des CSG en amont de MPK-1, alors qu'il agit de manière cellulaire non-autonome dans les cellules de la gaine gonadique lors de la signalisation homéostatique germinale. Mes résultats permettent de confirmer pour la première fois que le rôle suppresseur de tumeur de TIR-1 et de ses homologues est conservé dans un modèle invertébré. Mes données suggèrent que NSY-1, SEK-1, PMK-1, NIPI-3, MLK-1, MEK-1 et KGB-1 ont une fonction suppresseur de tumeurs chez *C. elegans*, alors que leurs homologues ont des rôles qui dépendent du contexte. En somme, mes travaux ont permis d'améliorer notre compréhension du mécanisme de régulation homéostatique des CSG chez *C. elegans*, et ouvrent de multiples perspectives d'études.

Bien que ma stratégie ait permis d'identifier avec succès de nouveaux gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie des CSG certaines limitations quant aux techniques utilisées doivent être mentionnées.

1. Limitations expérimentales de mon travail de recherche

1.1. Limitations liées à l'utilisation de mutations récessives stériles et d'un chromosome balancier

L'utilisation du fond génétique *oma-1,2*, dans lequel la maturation des ovocytes ne peut se produire, nécessite un artifice génétique pour contourner la stérilité de ces doubles mutants. L'approche que nous avons utilisée est de maintenir les deux mutations hétérozygotes en utilisant une translocation interchromosomique réciproque pour les balancer (Edgley *et al*, 2006). Premièrement, ces chromosomes ont subi un réarrangement de sorte qu'il n'y a aucune homologie de séquence entre la région balancée du chromosome « natif » et le balancier, ce qui permet d'éviter de perdre la mutation par recombinaison homologue lors de la méiose. Deuxièmement, le balancier contient un marqueur phénotypique qui permet d'identifier facilement les individus qui le portent. Ce marqueur peut être une protéine fluorescente (par exemple, l'insertion d'un transgène qui permet de marquer le pharynx avec la GFP, tel que *cpSi42*), ou un marqueur phénotypique visible comme un gain de fonction d'un gène qui confère le phénotype Rol (Roller, les vers ont un défaut au niveau de l'hypoderme, et tournent sur eux-mêmes). Troisièmement, le balancier contient une mutation récessive létale liée au réarrangement chromosomique.

Ainsi, les individus parentaux de génotype simplifié *oma-1/nT1 IV; oma-2/nT1 V* engendrent des descendants avec quatre classes de génotypes : (i) les hétérozygotes de génotype parental, *oma-1/nT1 IV; oma-2/nT1 V*, à une fréquence prédite de 4/16, Fe (fertiles), et identifiables par le marqueur phénotypique conféré par le balancier ; (ii) les homozygotes pour les mutations d'intérêt, *oma-1/oma-1 IV; oma-2/oma-2 V*, à une fréquence prédite de 1/16, Ste (stériles), et non-porteurs du marqueur phénotypique ; (iii) les homozygotes *nT1/nT1 IV; nT1/nT1 V*, à une fréquence prédite de 1/16, Let (létal) et (iv) les individus porteurs d'un nombre impair de balanciers ou

homozygotes pour un des deux balancers, à une fréquence de 10/16, et en raison d'un nombre anormal de doses de gènes. Les descendants viables d'un individu balancé sont donc les hétérozygotes de génotype parental, à une fréquence prédite de 4/5 de la descendance viable, ainsi que les homozygotes pour la mutation que l'on souhaite maintenir, à une fréquence prédite de 1/5 de la descendance viable, à condition qu'elle ne soit pas létale, dans notre cas *oma-1* et *oma-2*.

Les mutations qui auraient pu causer un phénotype Ghd à l'état homozygotes générées dans les balancers ne pourront pas être identifiées pour deux raisons : (i) les individus homozygotes pour les balancers ne sont pas viables et (ii) ces chromosomes ont des copies sauvages de *oma-1* et *oma-2*. L'utilisation des chromosomes balancers a donc divisé par 2 la probabilité d'obtenir une mutation causale dans les régions de réarrangements chromosomiques des chromosomes IV et V.

Les individus F1 issus de P0 mutagénisés sont présumés hétérozygotes pour toutes les mutations générées par l'agent chimique. La mutation causale *m* ou les mutations non-causales générées dans les chromosomes non-balancés (I, II, III et X) ont 50% de chances d'être homozygotes dans la F2. Une fois les individus homozygotes pour *m* sélectionnée, les mutations non-causales qui lui sont liées génétiquement ont davantage de chances d'être homozygotes, dépendamment de la distance génétique avec *m*, alors que les mutations non-causales sur des chromosomes indépendants ont 50% de chances d'être homozygotes. Cependant, étant donné les propriétés des balancers, l'absence de recombinaison homologue dans les régions de réarrangements chromosomiques, et la nécessité d'avoir des hétérozygotes pour respecter dosage allélique, et sachant que l'on a sélectionné les F2 viables porteurs des balancers, ces derniers sont obligatoirement porteurs des chromosomes homologues natifs, qui ont les mutations *oma-1* et *oma-2*. Par conséquent, les mutations non-causales portées par le chromosome natif ou par le balancer dans les régions de réarrangements chromosomiques n'ont pas pu être éliminées par recombinaison homologue, et ont été héritées de manière fixe, contrairement aux mutations non-causales sur les

chromosomes non-balancés et non-porteurs de *m*, qui avaient environ 50% de chance d'être homozygotes dans la F2. Dans le cas précis où *m* affecte un gène lié génétiquement à *oma-1* ou *oma-2*, elle serait hétérozygote dans les *oma-1/nT1*; *oma-2/nT1*, et homozygote dans leurs descendants *oma-1*; *oma-2*, où elle serait responsable d'un phénotype Ghd. Pour toutes ces raisons, l'utilisation des balanceurs nous a contraint à considérer les mutations hétérozygotes dans les régions de réarrangements chromosomiques, que ce soit sur le chromosome natif, ou le balanceur, indifférenciables lors du séquençage du génome entier, ce qui a mené à l'identification d'un plus grand nombre de candidats, à priori négatifs, dans les régions en question. Une stratégie alternative à l'utilisation de balanceurs pourrait être de générer un allèle perte de fonction conditionnel de *oma-1*, par l'ajout d'un dégron inductible à l'auxine (Zhang *et al*, 2015), et de le croiser dans un fond génétique *oma-2* homozygote mutant (ou vice-versa). Il s'agirait alors de mutagéniser des doubles mutants *oma-1::AID* ; *oma-2*, stériles, et d'induire la dégradation d'*oma-1* dans la F2 par traitement à l'auxine.

1.2. Limitations liées à l'approche de mutagenèse aléatoire

L'EMS provoque une alkylation de la guanine, ce qui forme une O⁶-éthylguanine. Lors de la phase S, l'ADN polymérase interprète cette base modifiée comme étant une alanine, et insère une thymine à la place de la cytosine, ce qui aboutit à une mutation ponctuelle (Sega, 1984). Une mutation ainsi générée peut aboutir à une perte du codon initiation, une perte d'un site donneur ou accepteur d'épissage, ou à l'apparition d'un codon stop prématuré dans le cadre ouvert de lecture, ce qui aurait un impact majeur sur la structure, et probablement la fonction, de la protéine. Par conséquent, la majorité des mutations délétères générées sont des hypomorphes. En d'autres termes, il n'est pas garanti que chaque mutation ponctuelle aboutisse à la perte de fonction du gène affecté. De plus, les mutations touchant des gènes dont la perte de fonction aboutit à un phénotype

Let n'ont pas pu être isolées. Or, nous savons que certains gènes qui jouent un rôle dans la signalisation homéostatique présentent un phénotype de létalité à effet maternel, par exemple *par-4* et *par-5*. Pour obtenir d'éventuelles mutations thermosensibles affectant des gènes essentiels, les descendants des P0 mutagénisés ont été maintenus dans des conditions permissives (à 15°C), et transférés dans des conditions restrictives (à 25°C) pour le criblage du phénotype Ghd. Il faut aussi noter que le nombre de mutations générées par gène dépend de sa longueur en paires de bases. En effet, un gène plus long subira statistiquement d'avantage de mutations qu'un gène plus court. Par exemple, le gène *ttn-1*, dont le cadre ouvert est de 45 kb, a subi 8 mutations indépendantes dans nos candidats issus du criblage.

Une approche classique pour réduire le nombre de gène candidats à l'issue d'un criblage génétique « sens » consiste à utiliser une souche polymorphique présentant des mutations ponctuelles (polymorphisme d'un seul nucléotide, SNP), permettant de baliser le génome (Doitsidou *et al*, 2010). À la suite du traitement des parents avec le mutagène, les individus présentant le trait phénotypique d'intérêt, et donc la mutation causale *m*, sont isolés. Ces individus sont ensuite croisés par une souche hawaïenne de *C. elegans* (CB4856) très divergente génétiquement de la souche de Bristol (N2). Cette souche polymorphique a un grand nombre de SNP et insertions/délétions distribués dans son génome (Wicks *et al*, 2001). Les individus de la F1 sont transhétérozygotes pour *m*, provenant des parents mutagénisés, et pour les SNPs, provenant de la souche polymorphique. Les SNP qui se trouvent sur un chromosome indépendant (non liés génétiquement) à *m* ont environ 50% de chances d'être hérités par les individus de la F2. Sur le chromosome où se trouve *m*, l'héritabilité des SNP dépend des chances de crossing-over entre le SNP et *m*, et donc de la distance génétique entre les loci (exprimée en centiMorgan, cM; 1cM = 1% de chances de recombinaison). Ainsi, les SNP qui sont à proximité de la mutation d'intérêt *m* auront moins de chances d'être hérités par les individus de seconde génération, car elle nécessite

une recombinaison homologue durant la méiose. Cependant, les régions de réarrangements chromosomiques dans les balanceurs n'auraient pas pu subir de recombinaison homologue avec le chromosome polymorphique, si bien qu'aucune mutation générée dans ces régions n'aurait été encadrée par des SNP. Cette approche aurait donc mené à une surestimation du nombre de candidats dans les chromosomes IV et V.

Une autre approche qui aurait permis de réduire le nombre de gènes candidats pour le premier criblage par ARNi que j'ai effectué (et qui a permis d'impliquer *tir-1*) est la « soustraction des semblables » (Joseph *et al.*, 2018). Cette approche consiste à isoler deux génotypes dans la descendance des P0 mutagénisés, dans notre cas les hétérozygotes *oma-1/nT1; oma-2/nT1* : (i) les F2 dont la descendance F3 homozygote *oma-1; oma-2* présente un phénotype Ghd majoritaire, et qui sont donc porteurs d'une mutation causale homozygote, *m/m*. La pénétrance du phénotype Ghd dans ces F3s devrait être supérieure aux 25% attendus dans la descendance des F1 porteurs de la mutation causale hétérozygote, *m/+* et (ii) Les F2s dont aucun descendant F3 homozygote *oma-1; oma-2* ne présente un phénotype Ghd, et qui sont homozygotes sauvages pour le gène d'intérêt, *+/+*. Les deux F2s, *m/m* et *+/+*, sont porteurs de mutations non-causales générées par l'EMS. En séquençant et en alignant le génome complet des deux populations F2 « semblables » *m/m* et *+/+*, les mutations communes, qui sont présentes dans les *+/+* mais qui n'aboutissent pas à un phénotype Ghd, pourraient ainsi être éliminées.

En somme, notre stratégie aura jusqu'ici permis d'isoler trois nouveaux allèles perte-de-fonction d'*aak-1*, un effecteur connu de l'homéostasie des CSG (Narbonne *et al.*, 2017), deux nouveaux allèles de *tir-1*, en plus d'une mutation dans *mlk-1* (dont la causalité reste à confirmer). Notre criblage génétique « sens » réalisé sur les individus balancés *oma-1/nT1; oma-2/nT1*, ainsi que notre analyse des données génomiques sous-jacente, constitue donc une approche valide pour identifier de nouveaux gènes requis dans la signalisation homéostatique.

1.3. Limitations de l'approche d'ARNi

L'ARNi permet de tester rapidement si la réduction de l'expression d'un gène candidat aboutit à un phénotype. Elle évite la nécessité d'avoir un allèle en plus d'effectuer un croisement génétique. Étant donné qu'un ARNi déclenche une réponse intracellulaire qui diminue l'expression d'un gène par la dégradation de son transcrit et en empêchant son expression ; il se peut que la proportion restante de transcrits non-dégradés et traduits soit suffisante pour assurer la fonction du gène en question. De la même manière, un ARNi peut avoir une homologie de séquence avec plusieurs transcrits codés par des gènes paralogues. Sachant que le nombre de complexes Dicer et RISC est limité dans une cellule, et qu'ils doivent prendre en charge tous les siARNs et miARNs d'une cellule, cela peut aboutir à une inhibition moins efficace de leur expression (par exemple, l'ARNi ciblant à la fois *kgb-1* et *kgb-2*). Pour la même raison, l'utilisation simultanée de deux ARNi peut aboutir à une réduction de l'expression génique moins efficace (par exemple, utiliser simultanément deux ARNi pour cibler *nmat-1* et *nmat-2*).

Il se peut également que la protéine codée par le gène d'intérêt soit suffisamment stable pour que réduire son expression au niveau post-transcriptionnel ne soit pas suffisant pour observer un phénotype. Par exemple, les intégrines sont des protéines très stables qui ont une demi-vie pouvant excéder les 24h (Lobert *et al*, 2010; Witkowski *et al*, 2000). Ainsi, l'approche d'ARNi peut aboutir à un phénotype incomplètement pénétrant ainsi que de sévérité variable, voir à une absence de phénotype. Pour limiter les chances d'obtenir des faux-négatifs, j'ai exposé les parents de l'individu criblé, ainsi que celui-ci pendant toute sa croissance, à l'ARNi.

D'autre part, l'utilisation d'ARNi ciblant des gènes dont la perte de fonction aboutit à un phénotype de létalité embryonnaire ou larvaire nécessite de traiter les individus plus tardivement, à partir du stade L4 ou jeune adulte. Cela empêche l'identification de mutations dans des gènes à effet maternel requis dans le processus biologique étudié, bien que le mécanisme de régulation

homéostatique intervienne chez l'adulte et qu'il est de ce fait peu probable que des gènes à effet maternel soient impliqués (et aucun gène que nous avons identifié jusqu'à présent ne semble avoir une telle fonction). Un traitement tardif limite également la période au cours de laquelle l'individu est exposé à l'ARNi. En effet, un individu exposé à partir du stade L1 aura probablement une réduction plus conséquente de l'expression du gène d'intérêt comparé à un individu exposé plus tardivement, au stade L4, notamment en raison de la stabilité de la protéine.

Enfin, certains tissus sont plus résistants aux ARNi (Kamath *et al*, 2003; Timmons *et al*, 2001). Le système nerveux, par exemple n'exprime pas le transporteur SID-1 permettant l'internalisation passive d'ARN double-brins (Calixto *et al*, 2010). Bien que nous n'ayons à ce jour identifié aucun module de signalisation requis dans les neurones pour la régulation de l'homéostasie des CSG, l'approche d'ARNi n'est pas optimale pour mettre en évidence de tels candidats. Le fait que nous ayons obtenu des phénotypes Ghd en utilisant des ARNi dirigés contre *tir-1*, *nsy-1*, *pmk-1*, *mlk-1*, *mek-1* et *kgb-1 kgb-2* suggère également une fonction non-neuronale dans le contrôle de la suraccumulation d'ovocytes pour ces différents gènes.

Ces limitations compliquent l'identification de nouveaux gènes requis dans un mécanisme biologique. Cela sous-entend également que nous ne puissions pas exclure de manière rigoureuse les candidats testés par ARNi qui n'aboutissent pas à un phénotype donné. Il est de ce fait envisageable de croiser une mutation du gène *rrf-3*, conférant une hypersensibilité aux ARNi (Sijen *et al*, 2001; Simmer *et al*, 2002), dans le fond génétique *oma-1*; *oma-2* et de re-tester tous les candidats négatifs que j'ai obtenus. Une alternative serait d'utiliser des pertes-de-fonction génétiques de ces candidats, ce qui permettrait de s'assurer que l'ensemble des produits géniques soient affectés, mais nécessiterait d'investir davantage de temps dans des croisements génétiques.

Deux approches permettent tout de même de s'assurer que l'ARNi utilisé est efficace pour réduire l'expression du gène cible. Premièrement, si la réduction de l'expression du gène aboutit à

un phénotype facilement reconnaissable décrit dans la littérature, par exemple comportemental, morphologique ou létal. La perte de fonction de nombreux gènes aboutit cependant à un phénotype sauvage ou difficilement vérifiable, par exemple une résistance accrue aux métaux lourds. Deuxièmement, il est possible de quantifier la quantité relative de transcrits du gène cible par RT-qPCR, et de s'assurer qu'elle a bien diminuée à la suite du traitement par ARNi. Cette approche aurait nécessité de nombreuses extractions d'ARNs, et aurait nécessité beaucoup de temps pour une approche de criblage. Finalement, la réduction des niveaux protéiques aurait pu être évaluée par immunobuvardage de type Western blot, mais cela aurait nécessité la disponibilité des anticorps appropriés.

L'approche d'ARNi peut également conduire à l'identification de faux-positifs, c'est pourquoi j'ai confirmé mes résultats ARNi avec des allèles.

1.4. Limitations liées à la quantification de l'indice mitotique

La quantification de l'IM est une approche avec une variabilité inhérente élevée, due à la taille réduite de la population de CSG et au nombre limité de cellules en phase M. (Fox *et al*, 2011). Par ailleurs, la prépondérance des gonades avec un indice mitotique nul dans les individus *fog-1* et *oma-1*; *oma-2* s'accompagne d'une distribution non-gaussienne des valeurs et de la nécessité d'utiliser le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis pour comparer les différents échantillons. Ce test attribue un rang à chaque valeur, de la plus faible à la plus élevée, et compare la somme des rangs plutôt que la moyenne des valeurs. Le test de Kruskal-Wallis est donc généralement moins puissant que l'ANOVA (paramétrique) pour rejeter l'hypothèse nulle, l'hypothèse de non-différence entre les échantillons. En outre, effectuer de multiples comparaisons nécessite d'utiliser le test post-hoc de Dunn pour corriger la valeur *p*, qui est la probabilité d'observer par hasard une différence au moins aussi extrême si l'hypothèse nulle est vraie. Plus le

nombre de comparaisons à effectuer est important, plus le post-hoc devient stringent. Cela permet de réduire le nombre de faux positifs mais a pour conséquence d'augmenter le nombre de faux négatifs. Ainsi, la quantification de l'IM n'est probablement pas une approche suffisamment sensible pour mettre en évidence la contribution de *tir-1* et de *nipi-3* à l'inhibition homéostatique des CSG. Une approche complémentaire serait de quantifier l'indice de phase S en effectuant une impulsion avec un analogue de la thymidine – comme le 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU) ou le 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) – qui est incorporé dans l'ADN au cours de la phase S (Fox *et al.*, 2011; Ito & McGhee, 1987). Une impulsion de 30 minutes permet d'obtenir un indice de phase S d'environ 55% dans les gonades sauvages (Furuta *et al.*, 2018). En comparaison, l'indice mitotique des gonades sauvages est d'environ 3%. Mesurer l'indice de phase S pourrait donc permettre de mettre en évidence des variations plus subtiles dans le taux de prolifération des CSG.

Une autre limitation est qu'un IM élevé peut être dû à un taux de prolifération élevé ou à l'arrêt de CSG en phase M. Néanmoins, les nombreuses cellules en phase M observées dans les doubles mutants féminisés de la voie p38 MAPK sont vraisemblablement la conséquence d'un taux de prolifération élevé, plutôt que d'un arrêt du cycle cellulaire. En effet, la perte de fonction de *pmk-1* dans le fond génétique *fog-1* aboutit à la formation et à la ponte d'un nombre important d'ovocytes endomitotiques et ces mutations induisent la formation de tumeurs bénignes dans le fond génétique *oma-1; oma-2*. Ces deux phénomènes ne peuvent pas s'expliquer simplement par un arrêt de CSG en phase M.

2. Implication de TIR-1/SARM1 dans la signalisation germinale homéostatique : un rôle suppresseur de tumeur conservé

TIR-1 et ses homologues ont été impliquées dans plusieurs processus biologiques, tels que l'immunité innée (Couillault *et al*, 2004; Liberati *et al*, 2004; Peterson *et al*, 2022; Tse-Kang *et al*, 2024), le développement du système nerveux (Chuang & Bargmann, 2005) et la neurodégénérescence, qu'elle soit wallérienne ou induite par l'ALS (Czech *et al*, 2023; Gerdt *et al*, 2015; Osterloh *et al*, 2012; Veriepe *et al*, 2015). Mes travaux ont permis de mettre en évidence un nouveau rôle pour TIR-1 dans la régulation de l'homéostasie des CSG de *C. elegans*.

2.1. La réduction de l'expression de certaines protéines à domaine SAM n'aboutit pas à une suraccumulation de cellules germinales différenciées

TIR-1 est composée de répétitions auto-inhibitrices de la famille armadillo, de deux domaines SAM et d'un domaine TIR. Les domaines SAM et TIR permettent l'interaction protéine/protéine avec d'autres protéines porteuses de domaines SAM ou TIR (Stapleton *et al*, 1999; Xu *et al*, 2000). Selon la base de données SMART (Letunic & Bork, 2025), 17 gènes codent pour des protéines à domaine SAM chez *C. elegans* (*ave-1*, *bcc-1*, *C05D10.4*, *C11E4.6*, *C46H3.2*, *cnk-1*, *dgk-4*, *F53B1.2*, *F53F8.5*, *hlb-1*, *m1t-3*, *nab-1*, *shn-1*, *syd-2*, *tir-1*, *zak-1* et *ZC190.4*) et 2 gènes codent pour des protéines à domaine TIR (*tir-1* et *tol-1*). J'ai émis l'hypothèse que les protéines correspondantes pourraient intervenir dans la signalisation homéostatique en interagissant physiquement avec TIR-1. Jusqu'ici, je n'ai toutefois pas observé que la diminution de l'expression d'un de ces gènes par ARNi, hormis *tir-1*, était suffisante pour aboutir à la formation d'une tumeur bénigne différenciée dans le fond génétique *oma-1,2*. Il faut cependant noter que l'utilisation d'ARNi n'aboutit pas nécessairement à une réduction significative de l'expression génique, et que les candidats testés ne peuvent être définitivement écartés pour le moment (**voir limitations**). Étant donné que je me suis focalisé sur les clones ARNi présents dans la librairie

disponible au laboratoire, l'implication d'*ave-1*, *bcc-1*, *C05D10.4*, *dgk-4*, *F53F8.5*, *mlt-3*, *nab-1* et *tol-1* dans la signalisation homéostatique n'a pas encore été testée.

2.2. La fonction enzymatique de TIR-1 pourrait ne pas être requise pour la signalisation homéostatique

Le domaine TIR a également une activité catalytique intrinsèque permettant l'hydrolyse du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) en ADP-ribose, ADP-ribose cyclique et nicotinamide. Cette activité NAD⁺ hydrolase est requise pour la neurodégénérescence wallérienne (Essuman *et al*, 2017; Gerdts *et al.*, 2015). Je me suis donc demandé si la fonction de TIR-1 dans le rétrocontrôle homéostatique nécessitait la consommation de NAD⁺, ou du moins si la signalisation homéostatique serait défectueuse dans le cas d'une diminution drastique de la quantité de NAD⁺. Deux voies métaboliques conservées permettent la biosynthèse du NAD⁺ : la synthèse *de novo*, dont le précurseur est le tryptophane, et la voie de recyclage du nicotinamide adénine mononucléotide. Ces deux voies nécessitent la fonction de protéines à double activité enzymatique nicotinamide/acide nicotinique mononucléotide adénylyltransférase (NMNAT) (Zhou *et al*, 2002). Le génome de *C. elegans* code pour deux protéines à activité NMNAT, NMAT-1 et NMAT-2 (Calixto *et al*, 2012; Mao *et al*, 2016). La diminution d'une de ces enzymes par ARNi, ou des deux simultanément, n'est toutefois pas suffisante pour induire un phénotype Ghd dans le fond génétique *oma-1,2*. Il faut encore une fois noter que l'utilisation d'ARNi n'aboutit pas nécessairement à la diminution significative de l'expression génique, de surcroît lors de l'utilisation simultanée de deux ARNi (**voir limitations**). En effet, la présence de descendants viables implique que la réduction supposée de *nmato-1* et *nmato-2* simultanément par ARNi n'a pas abouti à un phénotype de létalité complètement pénétrant, et suggère une réduction partielle de leur fonction. Si la fonction de TIR-1 nécessite la consommation de NAD⁺, alors les niveaux de NAD⁺ devraient diminuer dans des

individus féminisés ou *oma-1,2*. Il pourrait donc être informatif de quantifier les niveaux de NAD⁺ dans ces deux fonds génétiques (Wang *et al*, 2024). Cette variation pourrait toutefois être difficile à détecter si TIR-1 est requise, de la même manière que la signalisation *pmk-1/p38*, dans les cellules de la gaine gonadique. En effet, ces cellules représentent 20 des 2000 cellules qui constituent l’hermaphrodite adulte.

2.3. Contribution annexe de TIR-1 à la signalisation homéostatique

La perte de fonction de *tir-1* dans le fond génétique *oma-1; oma-2* aboutit à la suraccumulation de cellules germinales différenciées, sans impacter de manière significative l’IM des CSG. De la même manière, la perte de TIR-1 dans le fond génétique féminisé *fog-1* n’aboutit pas à une hausse significative de l’IM. Étant donné que la quantification de l’IM est sujette à une forte variabilité, cette approche n’est probablement pas assez sensible pour mettre en évidence la contribution de *tir-1* au mécanisme homéostatique. Une approche alternative serait de quantifier l’indice de phase S des CSG (**voir limitations**). L’observation du phénotype Ghd dans le fond génétique *oma-1; oma-2* en réponse à la perte de fonction d’un gène candidat est une approche qui permet de mettre en évidence, de manière sensible, la contribution de ce gène à la signalisation homéostatique. En effet, les cellules différenciées qui s’accumulent au fil de temps dans un triple mutant *oma-1; oma-2; ghd* permettent d’observer l’effet cumulatif d’une augmentation de la prolifération des CSG, même si celle-ci est légère.

2.4. Fonction spatiale de TIR-1 dans la signalisation homéostatique

Au cours de mon doctorat, j’ai généré des rapporteurs fluorescents en insérant une cassette permettant l’expression de la protéine fluorescente monomérique Neon Green (mNG) en 3’ du locus endogène de *tir-1*. Cela m’a permis de marquer toutes les isoformes de TIR-1, dont la partie

C-terminale est commune. Conformément à la littérature (Czech *et al.*, 2023; Peterson *et al.*, 2022), j'ai observé une forte expression de TIR-1::mNG dans les neurones et dans l'intestin. J'ai également observé une expression plus faible dans la gonade somatique, qui n'avait pas encore été décrite.

À cause de la pénétrance partielle du phénotype des *tir-1; oma-1; oma-2*, je n'ai pas tenté d'investiguer le tissu dans lequel TIR-1 est requise pour la signalisation homéostatique par sauvetage transgénique à l'aide de promoteurs tissu-spécifique. En effet, j'ai observé qu'environ 10% des vers transgéniques *aak-1; oma-1; oma-2; soma::aak-1(+)* n'étaient pas « sauvés » par le transgène, si bien que le sauvetage de *tir-1* ne devrait pas être parfait, lui non plus. De surcroît, la perte de fonction de *tir-1* aboutit à un phénotype Ghd incomplètement pénétrant (environ 80%) et de sévérité variable. Il aurait donc été délicat de déterminer si le phénotype intermédiaire d'un ver *tir-1; oma-1; oma-2; soma::tir-1(+)* est dû à la réintroduction de la copie sauvage de *tir-1*, ou à la pénétrance incomplète du phénotype Ghd.

Plutôt que de restaurer la fonction de *tir-1* dans un tissu spécifique, il apparaîtrait plus judicieux d'utiliser une perte de fonction tissu-spécifique. Cela permettrait de visualiser un phénotype Ghd, avec une certaine sévérité et pénétrance, qui contrasterait avec le phénotype constant des doubles mutants *oma-1; oma-2*.

Pour ce faire, je pourrais utiliser une souche mutante *rde-1*, résistante à l'ARNi (Tabara *et al.*, 1999), dans laquelle une copie sauvage de *rde-1*, et donc la sensibilité aux ARNi, est restaurée de manière tissu-spécifique (Qadota *et al.*, 2007). Cette approche aurait encore été compliquée à mettre en œuvre dans le fond génétique *oma-1; oma-2* à cause de la liaison génétique des loci *rde-1* et *oma-1* (1, 77 cM) qui rend difficile la construction d'une souche *rde-1 oma-1/nT1; oma-2/nT1*.

Une autre approche qui permettrait d'induire une perte de fonction tissu-spécifique de *tir-1* consiste à utiliser un système de dégradation bipartite comme le dégron inducible avec de l'auxine

(AID) (Zhang *et al.*, 2015). Il faudrait d'abord éditer le locus endogène de *tir-1* en 3', en utilisant la stratégie CRISPR-Cas9, pour insérer une cassette codant pour le dégron dans le dernier exon, en amont du codon stop. Cette approche pourrait être combinée à la stratégie de Dickinson *et al.* (Dickinson *et al.*, 2015) permettant par la même occasion de marquer la protéine de fusion avec un fluorochrome, ce qui permettrait de vérifier la dégradation de TIR-1::AID::mNG. Il faudra ensuite que je croise la lignée *tir-1::AID::mNG* avec des hétérozygotes *oma-1/nT1*; *oma-2/nT1*. Je croiserai alors le triple mutant *tir-1::AID::mNG*; *oma-1/nT1*; *oma-2/nT1* avec différentes souches qui expriment la protéine exogène TIR1 (une protéine végétale qui ne doit pas être confondue avec la protéine TIR-1 endogène de *C. elegans*) en aval de promoteurs spécifiques à différents tissus, pour obtenir des souches *tir-1::AID::mNG*; *oma-1/nT1*; *oma-2/nT1*; *tissu-spécifique::TIR1*. Après traitement à l'auxine, la protéine exogène TIR1 change de conformation, se lie à l'AID et induit l'ubiquitination et la dégradation de la protéine de fusion par le protéasome, dans le tissu d'intérêt. Lorsque le TIR-1 endogène sera dégradé dans le tissu où sa fonction est requise, le phénotype Ghd devrait apparaître.

2.5. Implication de TIR-1 et de ses homologues dans le contrôle de la prolifération et la cancérologie

L'implication de TIR-1/SARM1 dans la régulation de la prolifération cellulaire et au cours de la carcinogenèse est très peu caractérisée. SARM1 était l'un des gènes les plus fréquemment mutés dans le sang périphérique de 60 patientes avec des tumeurs malignes ovariennes, ce qui suggère un rôle suppresseur de tumeurs (Chen *et al.*, 2021). De plus, SARM1 interagit physiquement avec le récepteur à la capsaïcine TRPV1 pour empêcher la production de cytokines pro-inflammatoires et maintenir la quiescence des cellules étoilées du foie de manière cellulaire autonome (Tao *et al.*, 2023). En revanche, une étude a proposé une fonction pro-oncogénique. En

effet, SARM1 était surexprimée dans trois lignées de cancers cervicaux comparé à des kératinocytes contrôle (Morale *et al*, 2018) et la réduction de son expression dans des cellules HeLa aboutit à une diminution de leur survivabilité et à une augmentation de leur chimiosensibilité, de manière cellulaire autonome (Morale *et al*, 2022). Par ailleurs, Mes travaux montrent que le rôle suppresseur de tumeur SARM1 est conservé dans un modèle invertébré, *C. elegans* où elle agirait cette fois-ci de manière cellulaire non-autonome dans les cellules de la gaine gonadique pour réguler l'homéostasie des CSG. Si la fonction suppresseur de tumeur de TIR-1/SARM1 est à ce point conservé, c'est qu'elle doit être d'une importance cruciale, et il sera important de continuer à la caractériser dans le futur. Une partie de cette fonction pourrait être due à l'activation de la signalisation *pmk-1/p38*, comme dans de nombreux autres processus et réponses biologiques (Couillault *et al.*, 2004; Czech *et al.*, 2023; Liberati *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2022; Tse-Kang *et al.*, 2024; Veriepe *et al.*, 2015).

3. Implication de la signalisation *pmk-1/p38* dans la signalisation germinale homéostatique

Mes résultats ont permis de montrer que la signalisation canonique *pmk-1/p38*, NSY-1 → SEK-1 → PMK-1, régule la prolifération des CSG en amont de MPK-1, et agit dans les cellules de la gaine gonadique pour favoriser le rétrocontrôle homéostatique. Il s'agit d'un nouveau rôle pour ce module qui avait été précédemment étudié dans la réponse immunitaire innée (Liberati *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2022; Tse-Kang *et al.*, 2024), la réponse au stress (Inoue *et al.*, 2005; Pujol *et al*, 2008), le développement du système nerveux (Chuang & Bargmann, 2005; Sagasti *et al*, 2001; Tanaka-Hino *et al*, 2002), et la neurodégénérescence (Czech *et al.*, 2023; Veriepe *et al.*, 2015) (**Figure D-1**). À contrario, j'ai observé que la réduction présumée (ARNi) des niveaux des kinases

dlk-1, mkk-4, pmk-2, pmk-3 de la voie p38 MAPK (Nakata *et al*, 2005) ainsi que des autres kinases activées par le stress *sek-3* à *sek-6* n'aboutit pas à la formation d'une tumeur bénigne différenciée dans le fond génétique *oma-1; oma-2* (**Tableau A1**).

3.1. NSY-1, SEK-1 et PMK-1 sont moins pléiotropes que les autres effecteurs du rétrocontrôle homéostatique

Le fait que la perte de *nsy-1* ou *pmk-1* dans le fond génétique *fog-1* n'aboutisse pas à une diminution du nombre d'ovocytes au stade diakinèse malgré le taux élevé de prolifération et la ponte d'ovocytes endomitotiques suggère que, dans les doubles mutants, l'ovocyte -1 subit une maturation spontanée avant d'être mécaniquement expulsé et pondue lorsque l'accumulation dans la gonade proximale est trop importante. Puisque les doubles mutants féminisés de la voie p38 accumulent des ovocytes de la même manière que les simples *fog-1*, contrairement aux doubles *fog-1; daf-18, fog-1; par-4, fog-1; aak-1* et *fog-1; par-5* (Narbonne *et al.*, 2017), il semblerait que la voie p38 MAPK a un effet moins pléiotrope. Elle pourrait donc être partiellement requise en aval des autres gènes plus pléiotropes, potentiellement dans un nombre plus restreint de tissus, où elle régulerait un nombre moins important de mécanismes biologiques liés à la lignée germinale.

À contrario, j'ai observé que les doubles mutants féminisés *fog-1; sek-1* n'accumulent pas autant d'ovocytes au stade diakinèse que les simples *fog-1*. Même si j'ai obtenu ce résultat en utilisant un allèle porteur d'une mutation faux sens, *sek-1(ag1)*, qui aurait pu être un hypomorphe, j'ai observé le même phénotype incomplètement pénétrant en utilisant *sek-1(km4)*, un allèle avec une délétion de 2,1 kb et donc, potentiellement nul (**Figure A-2**). Une explication possible est que *sek-1* pourrait être en partie requis dans le contrôle de l'ovulation indépendamment de *nsy-1* et *pmk-1*, dans un autre tissu que les CGGs. En effet, une étude précédente a montré que SEK-1, indépendamment de NSY-1 et PMK-1, est requise au cours du développement masculin pour

l'élimination de la cellule de liaison qui guide l'élongation de la gonade masculine vers la région postérieure (Blum *et al*, 2012).

3.2. Fonction spatiale de la signalisation *pmk-1/p38* dans la signalisation homéostatique

Le patron d'expression de *pmk-1* avait été caractérisé en utilisant un gène rapporteur – l'insertion d'une cassette qui code pour la protéine fluorescente mNG en 3' du locus *pmk-1* endogène (Shin *et al*, 2018). La PMK-1 endogène avait été observée dans les neurones, l'hypoderme, l'intestin et les précurseurs de la vulve (Shin *et al.*, 2018). En utilisant le même transgène, j'ai observé une expression dans la gonade somatique, incluant les noyaux des cellules de la gaine gonadique et la spermathèque. L'expression de PMK-1 dans les noyaux des cellules de la gaine a pu être manquée car leur morphologie est semblable à celle des noyaux hypodermiques, qui se trouvent sur une couche légèrement plus superficielle.

En utilisant une approche classique de sauvetage tissu-spécifique par injection multicopie d'un transgène (Mello *et al*, 1991), j'ai mis en évidence que restaurer la fonction de SEK-1 dans les cellules de la gaine, mais pas les neurones, ni l'intestin ou la spermathèque, est suffisant pour rétablir le rétrocontrôle homéostatique de manière cellulaire non-autonome dans les doubles mutants féminisés *fog-1; sek-1*. Étant donné que la signalisation PMK-1/p38 MAPK fait intervenir des phosphorylations en cascade nécessitant des interactions physiques, il est fort probable que NSY-1 et PMK-1 soient également requises dans le même tissu. Mon travail est le premier, à ma connaissance, à mettre en évidence une fonction de la voie p38 MAPK dans les cellules de la gaine. La voie p38 MAPK a également été impliquée de manière cellulaire non-autonome pour la régulation de la prolifération des CS dans les follicules pileux murins. Durant la phase télogène, la Caspase-3 clive la phosphatase Dusp8, un inhibiteur de la voie p38 MAPK, ce qui déclenche un signal dépendant de Wnt3 stimulant la prolifération des CS avoisinantes (Ankawa *et al*, 2021).

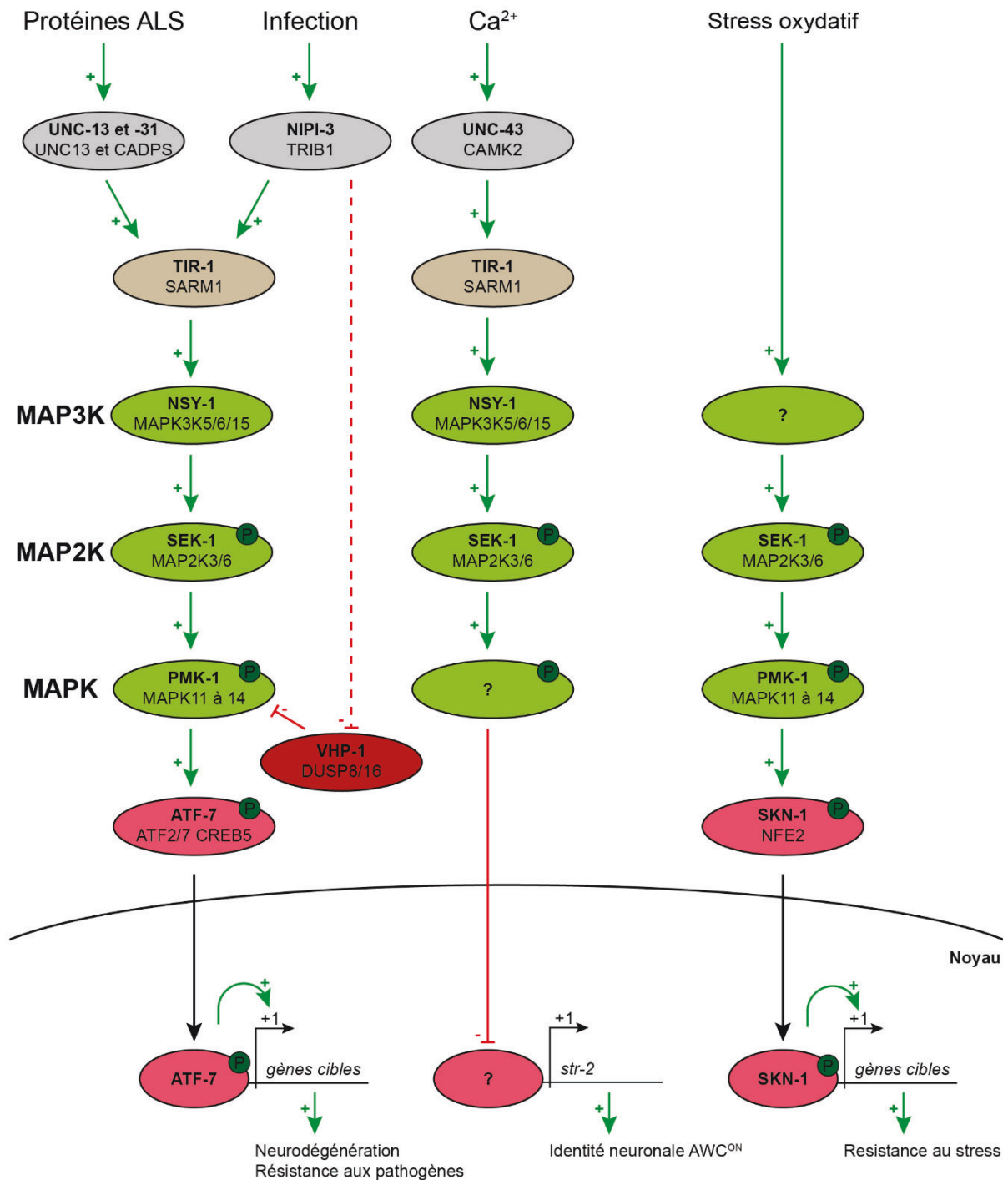


Figure D-1. La signalisation p38 MAPK de *C. elegans*. Flèche verte, activation ; barre rouge, inhibition. Vert, kinases ; rouge, phosphatase ; rose, facteurs de transcription ; gris/brun : autres protéines. La voie *pmk-1/p38* est impliquée dans le développement neuronal, la résistance aux stress et aux pathogènes, et dans la neurodégénérescence (wallérienne ou induite par des protéines de l'ALS). Adaptée de (Inoue *et al*, 2005).

En plus d'être essentielles dans le développement de la lignée germinale (Killian & Hubbard, 2005; McCarter *et al.*, 1997) ainsi que pour la maturation et l'ovulation des ovocytes dans les adultes (Greenstein, 2005), les cellules de la gaine ont une fonction cruciale dans l'homéostasie des CSG en contrôlant leur taux de prolifération. En effet, deux gènes impliqués dans la signalisation homéostatique sont requis dans les cellules de la gaine : *mpk-1*, qui stimule la prolifération des CSG de manière cellulaire non-autonome à partir de l'intestin et des cellules de la gaine (Robinson-Thiewes *et al.*, 2021) (Lloyd Venceslas Fotso Dzuna, *en préparation*), et AAK-1, dont la fonction est suffisante dans les cellules de la gaine pour restaurer le taux de prolifération des CSG dans les doubles mutants *fog-1; aak-1* (Xavier Lechasseur, *en préparation*). En outre, AAK-1 est requise en amont de MPK-1 dans le rétrocontrôle homéostatique (Xavier Lechasseur, *en préparation*). La manière dont la signalisation PMK-1/p38 et AAK-1 interagissent dans les CGG pour inhiber MPK-1 devra être caractérisée. De plus, il faudra déterminer si la signalisation PMK-1/p38 est responsable de l'inhibition de MPK-1 dans l'intestin et dans les cellules de la gaine, ou seulement dans les cellules de la gaine. Ce dernier cas pourrait suggérer qu'il existe un mécanisme homéostatique global responsable de l'activation de deux branches parallèles qui aboutit à l'inhibition de MPK-1 dans l'intestin et les cellules de la gaine.

3.3. Régulation de la prolifération par la signalisation *pmk-1/p38* : un mécanisme adaptatif ?

Une étude récente utilisant *C. elegans* a démontré que la PMK-1/p38 intestinale est requise dans l'élimination par apoptose des cellules germinales présentant des dommages à l'ADN, ce qui permet d'éviter l'hérédité de cellules aneuploïdes (Soltanmohammadi *et al.*, 2022). Mes découvertes renforcent le rôle cellulaire non-autonome de la signalisation PMK-1/p38 dans le contrôle de l'intégrité de la lignée germinale. Plus largement, je m'attends à ce que l'activation de PMK-1/p38, que ce soit par la réponse immunitaire innée ou par un autre type de stress, régule

négativement la prolifération des CSG. Une expérience intéressante serait d'infecter les *C. elegans* hermaphrodites adultes avec un agent pathogène, tel que *P. aeruginosa* ou *D. coniospora* (Jansson, 1994; Tan *et al*, 1999), et de quantifier l'IM pour vérifier si la prolifération des CSG a été significativement inhibée. On pourrait ensuite vérifier que cette régulation à la baisse de la prolifération des CSG nécessite l'activité PMK-1 en répétant l'expérience dans un mutant *pmk-1*. Si cette prédiction est exacte, et que le mécanisme moléculaire que je décris chez *C. elegans* est conservé à travers l'évolution, j'émetts l'hypothèse que contracter une infection puisse avoir un effet négatif sur la prolifération de certaines populations de CS, par le biais de l'activation de la signalisation PMK-1/p38. Ce mécanisme permettrait de favoriser la défense par rapport à la croissance, et pourrait constituer une stratégie adaptative pour mettre une pause sur la reproduction pour mieux promouvoir la survie de l'organisme. Dans le cas de *C. elegans*, promouvoir la quiescence des CSG durant la réponse immunitaire innée permettrait également d'empêcher de mettre au monde des descendants dans un milieu défavorable, et plus directement, d'avoir à exécuter des divisions cellulaires dans des conditions stressantes.

3.4. Rôle ambivalent de la voie p38 MAPK dans le contrôle de la prolifération et pathologies humaines

De nombreuses études ont investigué le rôle de la voie p38 MAPK dans la régulation de la prolifération cellulaire, et il existe pratiquement autant de preuves pour des fonctions proto-oncogéniques que suppresseur de tumeurs, dépendamment du contexte (Clouet & Narbonne, 2023; Martinez-Limon *et al*, 2020) (**manuscrit en annexe**).

Par exemple, dans des souris greffées avec des cellules de cancer cervical HeLa et traitées avec de l'ostéopontine, MAP2K3, MAP2K6 et p38 favorisent la croissance tumorale (Kumar *et al*, 2010). De plus, l'expression d'un dominant négatif de p38 aboutit à une inhibition de la

prolifération dans deux lignées cellulaires de cancers du sein (Chen *et al*, 2009). En outre, p38 favorise la prolifération des cellules épithéliales tumorales du colon murin, et l'inhibition génétique ou pharmacologique de p38 empêche la croissance des tumeurs (Gupta *et al*, 2014)

À contrario, dans l'intestin de souris âgées, l'inhibition pharmacologique de p38 aboutit à une augmentation du taux de prolifération des cellules progénitrices intestinales (He *et al*, 2020). De plus, dans des fibroblastes murins embryonnaires transfectées par un vecteur permettant l'expression d'une version oncogénique de Ras, Ha-Ras(Leu-61), MAP2K6 et p38 effectuent une boucle de rétroaction pour inhiber l'activité de Ras et la prolifération cellulaire (Chen *et al*, 2000a). En somme, une maladie orpheline humaine a pour étiologie la mutation autosomale dominante d'un effecteur de la voie p38.

Le cancer gastrique diffus héréditaire (CGDH, ORPHA : 26106) constitue 1 à 3% des cas de cancers gastro-intestinaux. Il s'accompagne de nausées, vomissements, dysphagie, et prédispose au développement d'autres types de cancers. Le CGDH touche plusieurs régions gastriques, ce qui rend son identification et son traitement difficiles. En outre, si le CGDH est diagnostiqué tardivement, le taux de survie des patient(e)s chute drastiquement à 20%. Le conseil génétique est la principale méthode de suivi et de prévention. En effet, le CGDH est associé à une mutation hétérozygote dominante dans CDH1 (E-Cadhérine), CTNNA1 (α -Caténine) ou MAP3K6 (MAP3K en amont de la voie p38 MAPK) (Benusiglio *et al*, 2019; Clark *et al*, 2020; Gaston *et al*, 2014; Guilford *et al*, 1998). Les principaux traitements sont l'ablation de l'estomac ou la chimiothérapie, lorsque le cancer est trop étendu. Il est donc crucial de comprendre les bases moléculaires du CGDH pour proposer de nouvelles thérapies adaptées aux patient(e)s. Mes travaux ont permis de montrer que NSY-1/MAP3K5/6/15 est requise pour l'inhibition homéostatique de la prolifération des CSG chez le *C. elegans* hermaphrodite. En effet, j'ai observé que la perte de fonction d'un des effecteurs de la voie PMK-1/p38 empêche ce mécanisme homéostatique, et aboutit à la formation

d'une tumeur comme dans le CGDH humain. L'étiologie du CGDH supporte l'hypothèse voulant que l'activation de la voie p38 MAPK par un stress mécanique aboutisse à l'inhibition de la prolifération cellulaire (**voir section 3**). En effet, le CGDH pourrait être causé par un défaut d'intégration de l'étirement tissulaire, à cause de la perte de fonction de CDH1 ou CTNAA1, ou par une transduction du signal défectueuse, en raison de la perte de MAP3K6. Dans les deux cas, l'incapacité d'activer p38 aboutirait à une prolifération cellulaire incontrôlée. De plus, des mutations faux-sens pathogéniques de PAR-4/LKB1 ont été identifiées dans des patient(e)s atteint(e)s de CGDH (Fewings *et al*, 2018), ce qui permet de renforcer le parallèle avec la signalisation homéostatique de *C. elegans*, qui requiert également ce facteur (Narbonne *et al.*, 2017). TIR-1/SARM1, SEK-1/MAP2K3/6 et PMK-1/p38, que j'ai identifiés comme étant nécessaire pour la signalisation homéostatique chez *C. elegans*, sont donc potentiellement aussi impliqués dans le CGDH. Ils pourraient être utilisés à des fins de diagnostic ou comme cibles dans le traitement de la pathologie. Les lignées mutantes de *C. elegans* que j'ai générées au cours de mon doctorat pourront servir de modèles expérimentaux pour étudier le rôle conservé de NSY-1/MAP3K5/6/15 (et de la voie p38 MAPK, en aval) dans l'inhibition de la prolifération cellulaire.

4. Implication d'interacteurs de la signalisation *pmk-1/p38* dans la signalisation germinale homéostatique

Après avoir mis en évidence l'implication de la signalisation *pmk-1/p38* dans le mécanisme homéostatique, je me suis demandé si des effecteurs connus pour agir en amont ou en aval de cette voie dans d'autres processus biologiques étaient également requis pour la mise en quiescence homéostatique des CSG.

4.1. UNC-43, ATF-7, SKN-1 et VHP-1 ne semblent pas être impliquées dans la signalisation homéostatique.

Au cours du développement du système nerveux, l'activation de TIR-1 et de la signalisation PMK-1/p38 requiert en amont la fonction de *unc-43*, l'homologue de la protéine kinase dépendante de la calmoduline 2 (CAMK2) (Chuang & Bargmann, 2005). Dans la réponse immunitaire innée antibactérienne, PMK-1 phosphoryle le facteur de transcription *atf-7*, ce qui induit un changement de sa conformation, le faisant passer de sa forme répressive à sa forme activatrice de la transcription (Shivers *et al*, 2009). Enfin, dans la réponse au stress oxydatif et dans la réponse immunitaire innée, PMK-1 phosphoryle et active le facteur de transcription SKN-1 (Inoue *et al.*, 2005). J'ai observé que la perte de fonction génétique d'*unc-43*, *atf-7* ou *skn-1* dans le fond génétique féminisé *fog-1* n'est pas suffisante pour empêcher la signalisation homéostatique (**Figure A-3**). Étant donné qu'UNC-43 fonctionne en amont de TIR-1, et que la perte de fonction de TIR-1 ne permet pas d'affecter significativement l'IM des individus féminisés, il faudrait que la réduction ou la perte de fonction d'*unc-43* dans le fond génétique *oma-1*; *oma-2* n'aboutisse pas à un phénotype Ghd pour exclure ce candidat de manière définitive.

Une autre régulatrice de la signalisation PMK-1/p38 est VHP-1, l'homologue de la phosphatase à double spécificité 8 (DUSP8). Des études précédentes ont montré que VHP-1 déphosphoryle et inhibe PMK-1 et KGB-1 (Kim *et al*, 2004; Mizuno *et al*, 2004). J'ai toutefois observé que les simples mutants *vhp-1* ont un IM similaire à celui d'animaux sauvages, ce qui suggère que VHP-1 n'inhibe pas constitutivement PMK-1 (et/ou KGB-1), et donc que la mise en quiescence homéostatique des CSG ne se produit pas par le biais de l'inhibition de VHP-1.

4.2. La phosphatase PP2A ne semble pas médier l'inhibition de MPK-1/ERK par PMK-1/p38

L'inhibition d'ERK, lorsqu'induite par p38, nécessite la fonction de la phosphatase intermédiaire PP2A dans les myocytes des ventricules cardiaques (Liu & Hofmann, 2004), dans des cultures de cellules endothéliales (Grethe & Porn-Ares, 2006) ou encore dans des cellules de leucémie (Liu *et al*, 2013). PP2A est un hétérotrimère constitué de trois sous-unités. Chez *C. elegans*, la sous-unité catalytique est codée par le gène *let-92*, la sous-unité d'échafaudage est codée par *paa-1*, et la sous-unité régulatrice peut-être codée par *sur-6*, *pptr-1*, *pptr-2*, *rsa-1* ou *cash-1* (Kao *et al*, 2004; Ogura *et al*, 2010; Padmanabhan *et al*, 2009; Pal *et al*, 2017; Schlaitz *et al*, 2007; Sieburth *et al*, 1999; Wang *et al*, 2014). Étant donné que la réduction par ARNi de *let-92*, qui devrait affecter tous les complexes, n'est pas suffisante pour induire un phénotype Ghd, l'inhibition homéostatique de MPK-1 ne semble pas nécessiter sa déphosphorylation par PP2A. Cependant, je n'ai pas quantifié le phénotype de létalité induit par l'ARNi, si bien que la diminution supposée de l'expression de *let-92* n'a pas été confirmée (**voir limitations**).

4.3. NIPI-3/TRIB1 empêche la formation de tumeurs germinales différenciées

Le gène *nipi-3* a été isolé au cours d'un criblage pour identifier des mutations empêchant la production de peptides anti-microbiens en réponse à une infection par *D. coniospora* (Pujol *et al.*, 2008). Des modèles contradictoires ont placé *nipi-3* en tant qu'activateur en amont de la voie *pmk-1/p38*, dépendamment (Pujol *et al.*, 2008) ou indépendamment de *tir-1*; par le biais de l'inhibition de VHP-1 (Wu *et al*, 2021) (**Figure D-1**), comme un régulateur négatif de *pmk-1* (Kim *et al*, 2016), ou suggéré que *nipi-3* fonctionne en parallèle de *pmk-1* (McEwan *et al*, 2016). Mes résultats suggèrent que *nipi-3* et *tir-1* fonctionnent dans la même cascade, plutôt qu'en parallèle, et qu'ils sont en partie responsable de l'activation de la voie canonique *pmk-1/p38*.

Les homologues de NIPI-3 peuvent aussi bien agir comme des proto-oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs, dépendamment du contexte. En effet, une augmentation de l'expression

de TRIB1 a été trouvée (i) dans une étude de cas d'une patiente atteinte de leucémie myéloïde aigue (Rothlisberger *et al*, 2007), (ii) dans des patientes affectées par le cancer du sein (McMillan *et al*, 2023) où TRIB1 favorise les transitions G1/S et G2/M du cycle cellulaire (Gendelman *et al*, 2017; McMillan *et al*, 2023), (iii) dans des lignées cellulaires et des patient(e)s atteint(e)s de cancers colorectaux (Camps *et al*, 2009) où TRIB1 promeut la migration et l'invasion et (iv) dans la prostate de souris qui ont une perte-de-fonction de PTEN (Shahrouzi *et al*, 2020) alors que la surexpression de TRIB1 favorise la prolifération tridimensionnelle des cellules de cancers de la prostate et la tumorigenèse dans des souris greffées (Mashima *et al*, 2014). À contrario, Tribbles régule négativement la prolifération des cellules du sillon ventral au cours de la gastrulation de la drosophile (Grosshans & Wieschaus, 2000; Mata *et al*, 2000) et TRIB1 inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses humaines en culture (Sung *et al*, 2007). Mes résultats consolident le rôle suppresseur de tumeur de NIPI-3/TRIB1 dans un autre modèle invertébré, *C. elegans*. Inhiber TRIB1 dans des stratégies anti-cancéreuses, si elle pouvait s'avérer avantageuse dans certains contextes, pourrait toutefois favoriser l'apparition de tumeurs dans d'autres tissus ou organes. Les lignées mutantes de *C. elegans* que j'ai générées au cours de mon doctorat pourront en outre être utilisés pour étudier le mécanisme d'inhibition de la tumorigenèse par NIPI-3 et ses homologues.

4.4. Facteurs en amont de NIPI-3, TIR-1 et de la voie p38 MAPK : hypothèse de l'étirement mécanique des cellules de la gaine gonadique

Une étude précédente a proposé que le déclencheur du signal homéostatique est l'accumulation d'ovocytes dans la gonade proximale (Narbonne *et al*, 2015). Cela signifie que la quantité d'ovocytes est intégrée en tout temps, et que le taux de prolifération des CSG est ajusté pour répondre au besoin en cellules différenciées. J'ai observé que la gonade proximale des simples mutants *fog-1* est étirée comparée à celle des individus sauvages. En outre, de nombreuses études

ont montré que p38 est activée en réponse à un étirement mécanique dans des cellules musculaires (Kook *et al*, 2008; Kumar *et al*, 2002; Lal *et al*, 2007; Liang & Gardner, 1999; Wernig *et al*, 2003; Zhan *et al*, 2007) et stromales (Gruden *et al*, 2000; Hoffman *et al*, 2017). Cette activation mécanosensible a également été observée lors de l'étirement de fibroblastes cardiaques de truites, ce qui semble indiquer un mécanisme conservé, au moins chez les vertébrés (Johnston & Gillis, 2020). J'ai donc émis l'hypothèse que les ovocytes qui s'accumulent, à partir d'un certain nombre, étirent mécaniquement les CGGs qui les entourent. L'intégration de cet étirement pourrait alors nécessiter la fonction de protéines faisant le lien entre les milieux extra- et intracellulaires. J'ai ainsi testé la réduction de fonction d'une partie de ces gènes par ARNi (**Tableau A2**). Parmi eux, j'ai jusqu'ici testé :

- Cinq gènes codant pour des isoformes de l'actine globulaire (*act-1* à *act-5*)
- Deux α -intégrines (*ina-1* et *pat-2*)
- Sept cadhérines (*cdh-1*, *cdh-3*, *cdh-4*, *cdh-5*, *cdh-9*, *fmi-1* et *hmr-1* ; *casy-1*, *cdh-7*, *cdh-8*, *cdh-10* et *cdh-12* n'ont pas encore été testées)
- Deux β -caténines (*bar-1* et *hmp-2* ; *sysm-1* et *wrm-1* n'ont pas encore été testées)
- L' α -caténine (*hmp-1*)
- La lamine (*lmn-1*)
- Une α -laminine (*epi-1* ; l' α *lam-3*, la β *lam-2* et la γ *lam-1* n'ont pas encore été testées)
- Treize des dix-huit gènes de la classe *mec*, permettant d'intégrer des stimuli mécanosensoriels externes (Chalfie & Au, 1989)
- Six canaux ioniques mécanosensibles (*ocr-2*, *osm-9*, *pezo-1*, *tmc-1*, *tmc-2*, et *unc-8*)

La diminution de l'activité d'aucun de ces gènes par ARNi n'a toutefois abouti à un phénotype Ghd. Ces résultats négatifs pourraient parfois être dus à de la redondance fonctionnelle et/ou à la stabilité des différentes protéines codées par les gènes testés et/ou à l'inefficacité de

certaines traitements ARNi. En outre, étant donné que certaines de ces protéines, sont requises dans de nombreux processus biologiques essentiels, comme l'actine qui est notamment requise pour la formation de l'anneau contractile lors de la cytokinèse, une réduction sévère de leur fonction à l'échelle de l'organisme pourrait avoir été délétère et empêché la formation de tumeurs de façon non-spécifique. Pour contourner ce problème, l'utilisation du dégron inducible avec de l'auxine pourrait être utilisé (Zhang *et al.*, 2015). Ce système permettrait de contrôler la temporalité de l'expression génique, spécifiquement dans les cellules de la gaine gonadique.

Deux résultats préliminaires partagés par mes collègues semblent néanmoins étayer l'hypothèse de l'étirement mécanique des cellules de la gaine. Premièrement, chez les doubles mutants *gld-3 nos-3*, dans lesquels les cellules germinales exécutent constitutivement des cycles mitotiques et forment une tumeur bénigne indifférenciées (**voir section 6 de l'introduction**) ; les cellules les plus distales, qui correspondraient à la zone de prolifération, ont un IM plus faible que les cellules proximales. Ce phénomène pourrait être dû au déclenchement de la signalisation homéostatique en réponse à la suraccumulation de cellules germinales indifférenciées, qui aboutirait à la mise en quiescence des CSG spécifiquement dans la zone de prolifération. En outre, ce résultat suggère que la signalisation homéostatique est intégrée par la CED, et que cette dernière est responsable de la mise en quiescence des CSG de manière paracrine (Patrick Narbonne, *communication personnelle*). De plus, dans les simples mutants *let-23*, qui ne peuvent pas déclencher l'ovulation de l'ovocyte le plus proximal (**voir section 5 de l'introduction**), l'IM des CSG est semblable à celui des individus sauvages dans les larves L4 et les jeunes adultes, et diminue drastiquement lorsque les ovocytes endomitotiques s'accumulent dans la gonade proximale. Cette mise en quiescence des CSG pourrait être due au rétrocontrôle homéostatique, déclenché par un étirement mécanique des cellules de la gaine, de la même manière que

l'accumulation d'ovocytes au stade diakinèse dans les vers Fem et Oma (Rustelle Janse Van Vuuren, *en préparation*).

5. Implication de la voie JNK MAPK dans la signalisation germinale homéostatique

Au cours d'un crible génétique sens, 9 candidats dans lesquels des cellules germinales différenciées s'accumulent de manière excessive dans la gonade proximale ont été isolés. J'ai déterminé que la perte de fonction d'*aak-1* et/ou de *tir-1* est responsable du phénotype tumoral dans 4 de ces candidats. Dans 1 des 5 restants, j'ai identifié une mutation perte-de-fonction putative entraînant la substitution d'un acide aminé conservé dans le domaine kinase de MLK-1, la MAP3K en amont d'un module JNK MAPK constitué de MEK-1 (MAP2K) et de KGB-1 (MAPK) (**Figure D-2**). J'ai également montré que l'inhibition de *mlk-1* par ARNi induit un phénotype similaire dans le fond *oma-1,2*. Il sera important d'effectuer un sauvetage phénotypique et/ou un test de complémentation pour confirmer que cette mutation est bien responsable du phénotype tumoral dans le candidat issu de la mutagenèse.

5.1. Interaction physique de TIR-1 avec KGB-1

En plus de son rôle dans l'activation de la voie PMK-1/p38, des données de crible double-hybride indiquent que TIR-1 peut interagir physiquement avec KGB-1 (Li *et al.*, 2004). Cette donnée permet de renforcer l'hypothèse de l'implication de la voie KGB-1/JNK dans le rétrocontrôle homéostatique. Pour déterminer si l'activation de la voie KGB-1/JNK est bien favorisée par TIR-1, il faudrait effectuer une réduction ou perte de fonction de *kgb-1/2* dans les triples mutants *tir-1; oma-1; oma-2* et observer si le phénotype Ghd devient plus pénétrant et/ou

plus sévère, ce qui suggérerait que les deux gènes agissent en parallèle. Le fait que le phénotype associé à la perte de TIR-1 soit incomplètement pénétrant et de sévérité variable semble contradictoire avec le fait qu'elle soit la régulatrice principale de deux voies parallèles, *pmk-1/p38* et *kgb-1/JNK*, dont la perte de fonction aboutit à un phénotype Ghd sévère, ainsi qu'à un IM élevé dans un fond féminisé. TIR-1 pourrait contribuer partiellement à l'activation de l'une ou l'autre des deux voies.. Alternativement, les deux voies pourraient réguler des processus biologiques indépendants, et non-redondants, qui empêchent la suraccumulation de cellules germinales différenciées.

5.2. Redondance fonctionnelle de KGB-1 et KGB-2

Le génome de *C. elegans* code pour quatre homologues de JNK MAPK, KGB-1, KGB-2, JNK-1 et C49C3.10. Pour le moment, mes travaux ont permis d'impliquer KGB-1 et/ou KGB-2 dans la régulation de la prolifération des CSG puisque le clone ARNi utilisé cible les deux gènes simultanément. KGB-1 joue un rôle dans la réponse aux pathogènes, aux métaux lourds, à la section des axones et aux espèces réactives de l'oxygène (Kim *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2018; Mizuno *et al.*, 2004; Nix *et al.*, 2011; Pastuhov *et al.*, 2012; Runkel *et al.*, 2013). KGB-1 est également impliquée dans des processus physiologiques dans des conditions non-stressantes, comme la fertilité et le vieillissement (Orsborn *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2002; Twumasi-Boateng *et al.*, 2012) (**Figure D-2**). La fonction de KGB-2 a été moins caractérisée et semble secondaire par rapport à celle de KGB-1. En effet, les deux rôles de KGB-2 décrits dans la littérature sont le sauvetage du défaut de fertilité induit par un excès de dioxyde de carbone, et un rôle mineur dans l'inhibition de la régénération axonale à la suite d'une blessure (Nix *et al.*, 2014; Vadasz *et al.*, 2012).

J'ai observé que la réduction de fonction simultanée de *kgb-1* et de *kgb-2* par ARNi aboutit à un phénotype Ghd incomplètement pénétrant. Cela peut être dû au fait que le transcrit d'un des

deux gènes, non requis pour la signalisation homéostatique, agisse comme une éponge, en empêchant une partie des ARNi de s'hybrider à l'autre transcrit pour diminuer son expression. Alternativement, *kgb-1* et *kgb-2* pourraient avoir une fonction redondante dans la signalisation homéostatique, de sorte que la réduction partielle de l'expression des deux gènes ne soit pas suffisante pour complètement empêcher la mise en quiescence des CSG. Il faudra donc tester l'impact de la simple perte de fonction de *kgb-1* et de *kgb-2* sur la signalisation homéostatique.

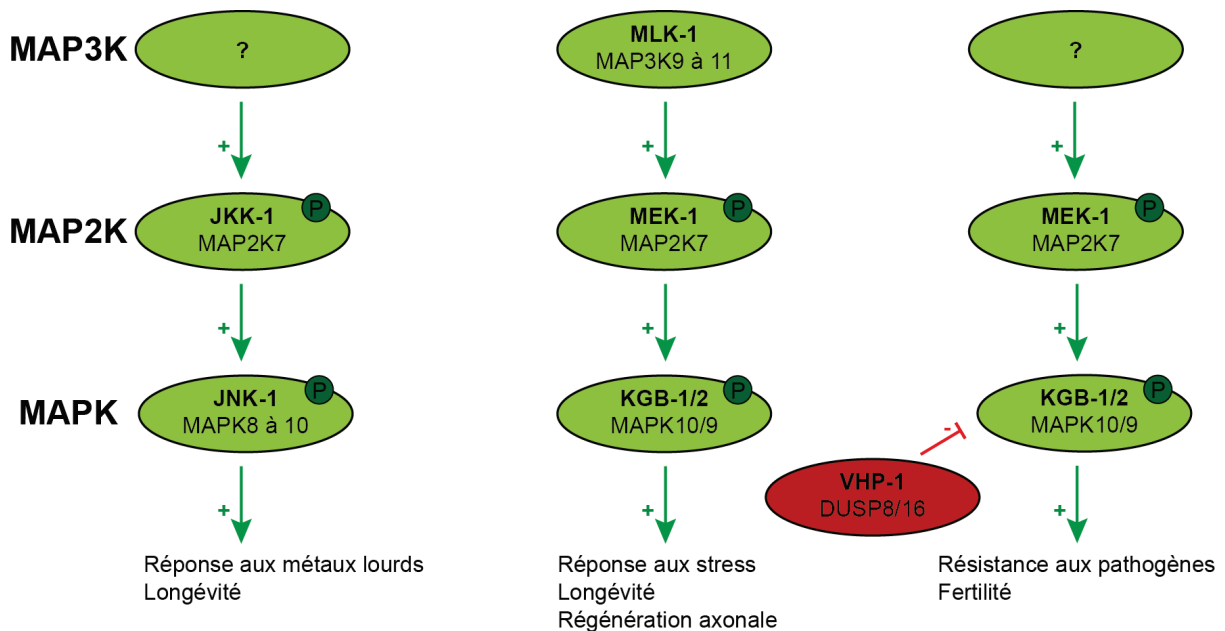


Figure D-2. La signalisation JNK MAPK de *C. elegans*. Flèche verte, activation ; barre rouge, inhibition. Vert, kinases ; rouge, phosphatase. La voie JNK MAPK est constituée de deux modules, permettant de répondre à différents types de stress et aux pathogènes. Ces modules favorisent la régénérescence axonale ainsi que la longévité. Adaptée de (Pastuhov *et al*, 2015).

5.3. Les voies p38 et JNK MAPK ne régulent pas l'homéostasie proliférative des cellules souches germinales de manière redondante

Nous aurions pu nous attendre à ce que l'utilisation de deux modules de signalisation confère une certaine robustesse au mécanisme de régulation homéostatique des CSG. J'ai été surpris de constater que la perte d'un effecteur du module p38 (NSY-1, SEK-1 ou PMK-1) ou du module JNK (MLK-1, MEK-1 ou KGB-1) est suffisante pour aboutir à la formation d'une tumeur bénigne différenciée dans le fond génétique *oma-1*; *oma-2* et/ou pour empêcher l'inhibition

homéostatique de la prolifération des CSG dans le fond *fog-1*. Ce résultat semble indiquer que les voies p38 et JNK MAPK agissent soit de manière séquentielle, avec un module requis en amont de l'autre, soit en parallèle. L'interaction entre les voies p38 et JNK a été relevée dans des travaux précédents. Dans la réponse immunitaire innée de *C. elegans*, la MAP2K MEK-1 agit en amont de PMK-1 et de KGB-1 (Kim *et al.*, 2004). De nombreuses interactions entre les deux voies ont également été observées en cancérologie (Wagner & Nebreda, 2009).

5.4. Fonction spatiale de la signalisation *kgb-1/JNK* dans la régulation des cellules souches germinales et de leur progéniture différenciée

Une étude précédente a généré des rapporteurs extra-chromosomiques de *kgb-1* en utilisant son promoteur endogène pour piloter l'expression de la protéine fluorescente verte (GFP) ou d'une protéine de fusion KGB-1::GFP. L'expression des transgènes est observable au cours de l'embryogenèse, du développement larvaire ainsi que chez l'adulte, dans le système nerveux, le pharynx, l'intestin, le système excréteur, les muscles longitudinaux et les gonades (Gerke *et al.*, 2014). Cette étude n'a cependant pas différencié la lignée germinale et la gonade somatique. En prenant en considération le patron d'expression de KGB-1 et ce qu'on sait sur la régulation homéostatique des CSG j'émetts trois conjectures concernant la fonction spatiale de la voie KGB-1/JNK.

Premièrement, mes expériences de sauvetage tissu-spécifique ont permis de montrer que SEK-1 (et vraisemblablement la signalisation PMK-1/p38) agit dans le même tissu qu'AAK-1 (Xavier Lechasseur, *en préparation*), la gaine gonadique. Nous n'avons pas encore déterminé quel signal permet d'inhiber MPK-1/ERK dans l'intestin, et la signalisation KGB-1/JNK pourrait bien être responsable de cette inhibition en parallèle ou en aval de la voie PMK-1/p38 dans la gaine. En effet, si la gaine est responsable de l'intégration de la quantité d'ovocytes, il est raisonnable de

penser que ce tissu orchestre le mécanisme en aval, possiblement par le biais de la voie PMK-1/p38 (**Figure D-3A**).

Une autre possibilité est que les voies PMK-1/p38 et KGB-1/2/JNK agissent séquentiellement dans la gaine gonadique pour inhiber MPK-1 dans ce même tissu, et éventuellement dans l'intestin. Comme nous l'avons vu, il existe des interactions entre les deux voies de signalisation, notamment dans la réponse immunitaire innée (Kim *et al.*, 2004) (**Figure D-3B**).

Enfin, la voie KGB-1/JNK pourrait être requise de manière cellulaire autonome dans la lignée germinale. Une étude précédente a montré que KGB-1 phosphoryle une des hélicases de la lignée germinale, GLH-1, et que cette phosphorylation aboutit à la dégradation de GLH-1 par le protéasome (Orsborn *et al.*, 2007). Les GLH sont des composantes constitutives des granules P, des particules ribonucléoprotéiques responsables du maintien de l'identité des cellules germinales en empêchant la traduction de transcrits spécifiques à la lignée somatique. En outre, la réduction de *glh-1* ou de *glh-4* par ARNi (mais pas de *glh-2* ou *glh-3*) aboutit à un phénotype de stérilité à 26°C, avec des lignées germinales qui contiennent environ 33% du nombre de cellules des gonades sauvages, ce qui suggère un défaut de prolifération (Kuznicki *et al.*, 2000). De plus, la réduction sévère de *kgb-1* en plaçant un allèle thermosensible à 26°C aboutit également à la stérilité, tandis que sa lignée germinale possède environ 20% plus de cellules que celles d'animaux sauvages (Orsborn *et al.*, 2007). De ce fait, le phénotype Ghd et/ou le fort IM observable dans le cas d'une réduction et/ou perte de fonction de la signalisation KGB-1/JNK pourrait ne pas être dus à un défaut d'inhibition de MPK-1 dans la gaine gonadique ou l'intestin, mais plutôt à un défaut de régulation d'une composante des granules P, GLH-1, dont l'accumulation pourrait favoriser la prolifération des CSG. Il faut tout de même noter que, contrairement au mécanisme homéostatique, la perte de MEK-1 aboutit à une accumulation moins importante de GLH-1 par rapport à KGB-1, alors que

MLK-1 n'a pas été investiguée dans ce processus (Orsborn *et al.*, 2007). Par ailleurs, alors que la réduction de *kgb-1* et *kgb-2* devrait aboutir à une prolifération plus élevée à cause de l'accumulation de GLH-1 ; les doubles mutants ont un IM similaire à celui des sauvages à 25°C. Cela peut être dû à une réduction de fonction moins importante qu'à 26°C, d'autant plus que le phénotype stérile est partiellement sauvé à 25°C (**Figure D-3C**).

Trois expériences seront cruciales pour trancher entre ces trois hypothèses. Premièrement, un test d'épistasie entre *kgb-1/2* et *mpk-1* permettra de déterminer si *kgb-1/2* agit dans la même voie et en amont de *mpk-1* (IM faible, comme les simples mutants *mpk-1*) ou en aval/indépendamment de *mpk-1* (IM élevé, comme les doubles *kgb-1 kgb-2*). Deuxièmement, des expériences de sauvetage tissu spécifiques permettront de déterminer dans quel tissu la voie JNK MAPK est requise (par réintroduction d'une copie sauvage de *kgb-1* en aval d'un promoteur spécifique de l'intestin, *elt-7*, des cellules de la gaine gonadique, *lim-7* ou de la lignée germinale, *mex-5*) Troisièmement, il faudrait effectuer une réduction ou perte de fonction de GLH-1 dans les triples mutants féminisés *fog-1; kgb-1 kgb-2*. En effet, si dans le fond génétique *fog-1*, KGB-1 et/ou KGB-2 favorisent la dégradation de GLH-1, ce qui permettrait de maintenir la prolifération des CSG indépendamment de l'inhibition de MPK-1, alors la réduction de *kgb-1* et *kgb-2* aboutirait à une accumulation de GLH-1, et donc à un échec de la mise en quiescence des CSG. En outre, la réduction de l'expression de *glh-1* dans les simples mutants *kgb-1* permet de restaurer partiellement leur fertilité (Orsborn *et al.*, 2007).

5.5. Rôle ambigu de la voie JNK MAPK dans le contrôle de la prolifération cellulaire

De la même manière que les effecteurs de la voie p38 MAPK et la pseudokinase TRIB1, les homologues de la voie JNK MAPK jouent un rôle variable dans le contrôle de la prolifération

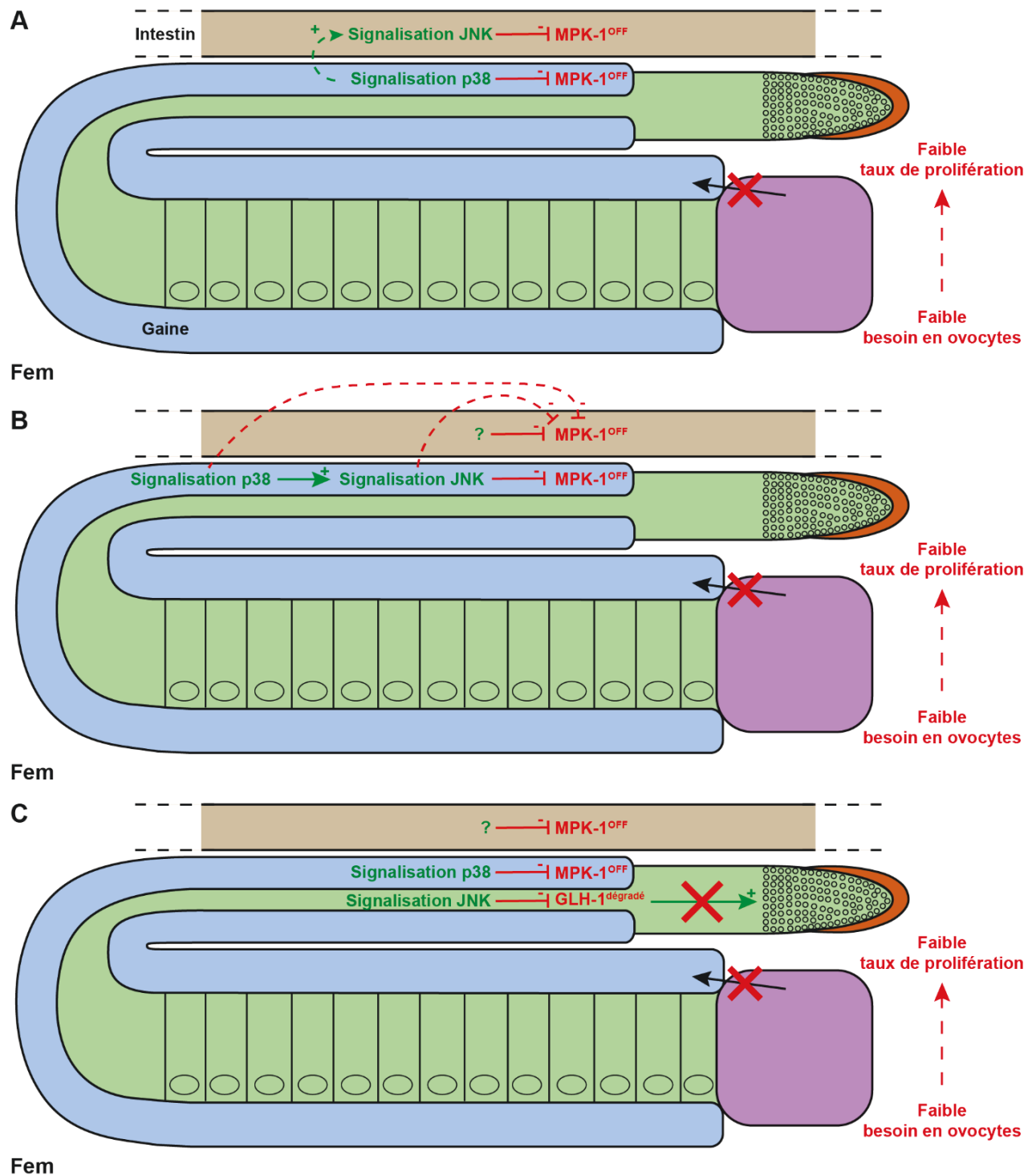


Figure D-3. Mécanismes proposés : régulation de l'homéostasie proliférative des CSG par les voies p38 et JNK MAPK. (A-C) Schématisation d'une gonade antérieure. Les organes et leur code couleur sont similaires à la figure I-3B. Flèche verte, stimulation ; barre rouge, inhibition. Antérieur, à gauche ; dorsal, en haut. (A) Les signalisations *pmk-1/p38* et *kgb-1/jnk* agissent en parallèle pour contrôler l'inhibition de MPK-1 dans deux tissus différents. (B) Les deux signalisations agissent séquentiellement dans la gaine pour inhiber MPK-1 (les deux signalisations sont interchangeable dans le schéma). (C) La signalisation *kgb-1/jnk* régule négativement la prolifération des CSG en favorisant la dégradation de GLH-1, une protéine constitutive des granules P. (B-C) Le mécanisme permettant l'inhibition de la MPK-1 intestinale restera à identifier.

cellulaire, et peuvent être des proto-oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs dépendamment du contexte.

Par exemple, les homologues de MLK-1 et KGB-1 dans la drosophile, *Hemipterous* et *Basket*, respectivement, favorisent la prolifération des cellules folliculaires avant leur transition vers l'endocycle (Jordan *et al*, 2006). De plus, l'homologue humaine de JNK-1 et KGB-2, MAPK9 (JNK2), est surexprimée dans les carcinomes épidermoïdes (Ke *et al*, 2010) et son inhibition génétique ou pharmacologique permet de diminuer la tumorigenèse (Ke *et al.*, 2010). Enfin, la réduction par ARNi de MAPK10 (JNK3), l'homologue de JNK-1 et KGB-1, aboutit à un taux de prolifération réduit dans les cellules β pancréatiques de souris post-natales (Tenenbaum *et al*, 2021).

D'autres études soulignent le rôle suppresseur de tumeur de la voie JNK MAPK. En effet, l'homologue humaine de MEK-1, MAP2K7, ainsi que MAPK9 agissent comme des suppresseurs de tumeurs dans les cancers du poumon et mammaires en stabilisant p53 (Schramek *et al*, 2011). En somme, une autre homologue de JNK-1, MAPK8 (JNK1) ainsi que MAPK9 ont des rôles opposés dans la régulation de la prolifération cellulaire de fibroblastes murins, embryonnaires ou immortalisés, en favorisant respectivement la stabilisation ou la dégradation de c-JUN (Fuchs *et al*, 1996; Sabapathy *et al*, 2004). Les érythroblastes et hépatocytes des souris perte-de-fonction de MAPK9 ont également un taux de prolifération accru (Sabapathy *et al.*, 2004; Sabapathy & Wagner, 2004). Il pourrait donc être intéressant de tester si la réduction ou la perte de fonction de *jun-1*, l'homologue de c-JUN chez *C. elegans*, permet de restaurer la quiescence des CSG dans les triples mutants *fog-1; kgb-1 kgb-2*. Mes résultats suggèrent que le module MLK-1/MAP3K9 à 11 → MEK-1/MAP2K7 → KGB-1, 2/MAPK10, 9, empêche la suraccumulation de cellules germinales différenciées dans le fond génétique *oma-1, 2* et que KGB-1, 2 favorise la mise en quiescence des CSG dans un fond génétique féminisé. À ma connaissance, excepté pour KGB-

1/MAPK10 (Orsborn *et al.*, 2007), mes données suggèrent pour la première fois que le rôle suppresseur de tumeurs de MLK-1/MAP3K9-11 et MEK-1/MAP2K7 pourrait être conservé depuis les invertébrés. Il sera crucial de déterminer si ce rôle fait partie de la signalisation homéostatique, ou s'il s'agit d'un effet secondaire de la levée d'inhibition de GLH-1.

6. Perspective : étude du phosphoprotéome et de l'interactome des p38 et JNK MAPK

Mes travaux de recherche ont mis en évidence que la signalisation homéostatique nécessite des phosphorylations en cascade par des kinases de la superfamille des MAPK. Plus précisément, j'ai identifié la signalisation *pmk-1/p38* qui est requise dans les cellules de la gaine gonadique, et la voie *kgb-1/JNK* dont la fonction spatiale reste à déterminer. Deux autres kinases avaient également été impliquées dans le rétrocontrôle homéostatique, PAR-4 et AAK-1, tandis que cette dernière agit dans les cellules de la gaine pour promouvoir la signalisation homéostatique (Xavier Lechasseur, *en préparation*).

Il serait donc intéressant de caractériser l'ensemble des protéines phosphorylées par ces différentes kinases lorsque le rétrocontrôle homéostatique est actif. Un projet a récemment été initié par ma collègue de laboratoire, Armi Chaudhari, pour étudier le phosphoprotéome d'individus sauvages et féminisés, dans la gaine gonadique et dans l'intestin (les deux tissus où MPK-1 doit être inhibée par la signalisation homéostatique). Ce projet devrait permettre de dresser une liste de gènes candidats dont la phosphorylation est enrichie dans les vers féminisés où la signalisation homéostatique, et donc les kinases que nous avons identifiées, sont actives. Il serait également intéressant de comparer le phosphoprotéome des cellules de la gaine de simples mutants féminisés *fog-1* avec celui de doubles mutants féminisés de la voie p38 MAPK (*fog-1; nsy-1, fog-1; sek-1*

et/ou *fog-1*; *pmk-1*). Les protéines phosphorylées enrichies dans les simples mutants et fortement réduite dans les doubles pourraient constituer des gènes candidats prometteurs pour la signalisation homéostatique.

Ces gènes candidats pourraient être des inhibiteurs ou des activateurs de la prolifération, et pourraient donc être activés ou inhibés par les kinases de la voie *pmk-1/p38* lors du rétrocontrôle homéostatique. Il faudra donc coupler cette approche descriptive à une approche fonctionnelle, notamment en effectuant un criblage ARNi des gènes candidats. Ce crible devra être effectué dans le fond génétique *oma-1*; *oma-2* pour observer si la diminution de leur expression aboutit au phénotype Ghd, ou dans le fond génétique *tir-1*; *oma-1*; *oma-2* ou *oma-1*; *oma-2*; *sek-1* pour voir si leur diminution aboutit au sauvetage du phénotype Ghd.

Cette approche pourra être reproduite en comparant le phosphoprotéome des vers féminisés *fog-1* avec celui des triples *fog-1*; *kgb-1* *kgb-2*, dans les vers entiers ou dans le tissu où la voie JNK MAPK est requise.

Pour identifier les interacteurs physiques des kinases que j'ai identifiées, indépendamment de leur phosphorylation, une approche de liaison de proximité pourrait être utilisée (Artan *et al*, 2021; Branon *et al*, 2018; Sanchez *et al*, 2021). Il s'agirait dans un premier temps de générer un transgène codant pour une protéine de fusion entre notre kinase et le TurboID (une biotine ligase), et de l'insérer dans le génome. En effectuant une impulsion avec de la biotine, le TurboID va conjuguer les protéines qui interagissent physiquement avec notre kinase, qu'ils agissent en amont ou en aval. Les protéines biotinylées seront alors purifiées en utilisant des billes recouvertes de streptavidine et analysées par spectrométrie de masse. Cette approche serait avant tout utile, par rapport au phosphoprotéome, pour identifier les partenaires physiques non-phosphorylés en amont des kinases NSY-1 et MLK-1, mais ne permettrait pas de détecter une interaction non-physique, comme l'activation de la kinase par une petite molécule.

CHAPITRE V

Conclusion

Mes résultats forment, à ma connaissance, la deuxième preuve fonctionnelle du rôle suppresseur de tumeur de TIR-1/SARM1, et la première indication de la conservation de ce mécanisme dans un organisme modèle invertébré. Il sera important de continuer de caractériser cette fonction, étant donné que la mutation de SARM1 est associée à l'apparition de certains cancers. SARM1 pourrait empêcher la formation de tumeurs humaines en activant la signalisation PMK-1/p38, KGB-1, 2/JNK, et/ou en interagissant avec les homologues d'autres gènes de la signalisation homéostatique.

En outre, mes données mettent en évidence un nouveau rôle pour les voies *pmk-1/p38*, *kgb-1*, 2/*JNK* et la pseudokinase *nipi-3/TRIB1* de *C. elegans*, et suggèrent que la fonction suppresseur de tumeurs de leurs homologues est conservée jusque dans les invertébrés. L'implication d'un (ou deux) module(s) de réponse aux stress, *pmk-1/p38* (et possiblement *kgb-1/JNK*), remet en perspective notre compréhension de la signalisation germinale homéostatique et nous amène à nous interroger sur le stimulus initial permettant de déclencher la cascade aboutissant à l'inhibition de MPK-1/ERK dans la gaine gonadique et l'intestin. La prochaine étape sera d'identifier la nature de ce stimulus ainsi que de son intégration. Il sera par ailleurs intéressant de déterminer si un stress exogène, comme une infection, peut aboutir à la mise en quiescence des CSG par le biais de l'activation des voies PMK-1/p38 et/ou KGB-1/JNK, et permettrait de mettre en évidence un mécanisme adaptatif qui pourrait être conservé à travers l'évolution.

Une autre perspective excitante ouverte par ce travail sera de caractériser l'ensemble des protéines phosphorylées par les kinases des voies *pmk-1/p38*, et éventuellement *kgb-1/JNK*, lorsque

la signalisation homéostatique est active. Cela permettra de mieux comprendre le mécanisme moléculaire dépendant des voies MAPK activées par le stress permettant d'inhiber MPK-1/ERK lorsque les besoins en ovocytes sont faibles. Étant donné qu'il existe des preuves de l'existence de signalisations couplant la prolifération des CS aux besoins du tissu en cellules différenciées dans d'autres espèces (Hsu *et al*, 2011; Jiang *et al*, 2009; Mondal *et al*, 2011; Valet & Narbonne, 2022), décrypter les bases moléculaires de la régulation homéostatique des CSG de *C. elegans* permettra d'identifier des mécanismes qui s'opposent à la formation de tumeurs bénignes, lesquelles pourraient constituer la première étape du développement d'un cancer.

RÉFÉRENCES

- Adamo A, Collis SJ, Adelman CA, Silva N, Horejsi Z, Ward JD, Martinez-Perez E, Boulton SJ, La Volpe A (2010) Preventing nonhomologous end joining suppresses DNA repair defects of Fanconi anemia. *Mol Cell* 39: 25-35
- Ahringer J, Kimble J (1991) Control of the sperm-oocyte switch in *Caenorhabditis elegans* hermaphrodites by the fem-3 3' untranslated region. *Nature* 349: 346-348
- Ahringer J, Rosenquist TA, Lawson DN, Kimble J (1992) The *Caenorhabditis elegans* sex determining gene fem-3 is regulated post-transcriptionally. *EMBO J* 11: 2303-2310
- Alpi A, Pasierbek P, Gartner A, Loidl J (2003) Genetic and cytological characterization of the recombination protein RAD-51 in *Caenorhabditis elegans*. *Chromosoma* 112: 6-16
- Ankawa R, Goldberger N, Yosefzon Y, Koren E, Yusupova M, Rosner D, Feldman A, Baror-Sebban S, Buganim Y, Simon DJ *et al* (2021) Apoptotic cells represent a dynamic stem cell niche governing proliferation and tissue regeneration. *Dev Cell* 56: 1900-1916 e1905
- Aono S, Legouis R, Hoose WA, Kempthues KJ (2004) PAR-3 is required for epithelial cell polarity in the distal spermatheca of *C. elegans*. *Development* 131: 2865-2874
- Artan M, Barratt S, Flynn SM, Begum F, Skehel M, Nicolas A, de Bono M (2021) Interactome analysis of *Caenorhabditis elegans* synapses by TurboID-based proximity labeling. *J Biol Chem* 297: 101094
- Arur S, Ohmachi M, Berkseth M, Nayak S, Hansen D, Zarkower D, Schedl T (2011) MPK-1 ERK controls membrane organization in *C. elegans* oogenesis via a sex-determination module. *Dev Cell* 20: 677-688
- Austin J, Kimble J (1987) glp-1 is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. *Cell* 51: 589-599
- Barton MK, Kimble J (1990) fog-1, a regulatory gene required for specification of spermatogenesis in the germ line of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 125: 29-39
- Barton MK, Schedl TB, Kimble J (1987) Gain-of-function mutations of fem-3, a sex-determination gene in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 115: 107-119
- Bauer J, Poupart V, Goupil E, Nguyen KCQ, Hall DH, Labbe JC (2021) The initial expansion of the *C. elegans* syncytial germ line is coupled to incomplete primordial germ cell cytokinesis. *Development* 148
- Benusiglio PR, Colas C, Guillermin E, Canard A, Delhomelle H, Warcoin M, Bellanger J, Eyries M, Zizi M, Netter J *et al* (2019) Clinical implications of CTNNA1 germline mutations in asymptomatic carriers. *Gastric Cancer* 22: 899-903
- Bernstein D, Hook B, Hajarnavis A, Opperman L, Wickens M (2005) Binding specificity and mRNA targets of a *C. elegans* PUF protein, FBF-1. *RNA* 11: 447-458
- Berry LW, Westlund B, Schedl T (1997) Germ-line tumor formation caused by activation of glp-1, a *Caenorhabditis elegans* member of the Notch family of receptors. *Development* 124: 925-936
- Biedermann B, Wright J, Senften M, Kalchauer I, Sarathy G, Lee MH, Ciosk R (2009) Translational repression of cyclin E prevents precocious mitosis and embryonic gene activation during *C. elegans* meiosis. *Dev Cell* 17: 355-364
- Blum ES, Abraham MC, Yoshimura S, Lu Y, Shaham S (2012) Control of nonapoptotic developmental cell death in *Caenorhabditis elegans* by a polyglutamine-repeat protein. *Science* 335: 970-973

Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, Udeshi ND, Svinkina T, Carr SA, Feldman JL, Perrimon N, Ting AY (2018) Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol* 36: 880-887

Brenner JL, Schedl T (2016) Germline Stem Cell Differentiation Entails Regional Control of Cell Fate Regulator GLD-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 202: 1085-1103

Calixto A, Chelur D, Topalidou I, Chen X, Chalfie M (2010) Enhanced neuronal RNAi in *C. elegans* using SID-1. *Nat Methods* 7: 554-559

Calixto A, Jara JS, Court FA (2012) Diapause formation and downregulation of insulin-like signaling via DAF-16/FOXO delays axonal degeneration and neuronal loss. *PLoS Genet* 8: e1003141

Camps J, Nguyen QT, Padilla-Nash HM, Knutsen T, McNeil NE, Wangsa D, Hummon AB, Grade M, Ried T, Difilippantonio MJ (2009) Integrative genomics reveals mechanisms of copy number alterations responsible for transcriptional deregulation in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 48: 1002-1017

Chalfie M, Au M (1989) Genetic control of differentiation of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *Science* 243: 1027-1033

Chen G, Hitomi M, Han J, Stacey DW (2000a) The p38 pathway provides negative feedback for Ras proliferative signaling. *J Biol Chem* 275: 38973-38980

Chen J, Li Y, Wu J, Liu Y, Kang S (2021) Whole-exome sequencing reveals potential germline and somatic mutations in 60 malignant ovarian germ cell tumors. *Biol Reprod* 105: 164-178

Chen L, Mayer JA, Krisko TI, Speers CW, Wang T, Hilsenbeck SG, Brown PH (2009) Inhibition of the p38 kinase suppresses the proliferation of human ER-negative breast cancer cells. *Cancer Res* 69: 8853-8861

Chen PJ, Singal A, Kimble J, Ellis RE (2000b) A novel member of the tob family of proteins controls sexual fate in *Caenorhabditis elegans* germ cells. *Dev Biol* 217: 77-90

Cheng E, Lu R, Gerhold AR (2024) Non-autonomous insulin signaling delays mitotic progression in *C. elegans* germline stem and progenitor cells. *PLoS Genet* 20: e1011351

Chin-Sang ID, Spence AM (1996) *Caenorhabditis elegans* sex-determining protein FEM-2 is a protein phosphatase that promotes male development and interacts directly with FEM-3. *Genes Dev* 10: 2314-2325

Christensen S, Kodoyianni V, Bosenberg M, Friedman L, Kimble J (1996) lag-1, a gene required for lin-12 and glp-1 signaling in *Caenorhabditis elegans*, is homologous to human CBF1 and *Drosophila* Su(H). *Development* 122: 1373-1383

Chu DS, Dawes HE, Lieb JD, Chan RC, Kuo AF, Meyer BJ (2002) A molecular link between gene-specific and chromosome-wide transcriptional repression. *Genes Dev* 16: 796-805

Chuang CF, Bargmann CI (2005) A Toll-interleukin 1 repeat protein at the synapse specifies asymmetric odorant receptor expression via ASK1 MAPKKK signaling. *Genes Dev* 19: 270-281

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

Clandinin TR, DeModena JA, Sternberg PW (1998) Inositol trisphosphate mediates a RAS-independent response to LET-23 receptor tyrosine kinase activation in *C. elegans*. *Cell* 92: 523-533

Clark DF, Michalski ST, Tondon R, Nehoray B, Ebrahimzadeh J, Hughes SK, Soper ER, Domchek SM, Rustgi AK, Pineda-Alvarez D *et al* (2020) Loss-of-function variants in CTNNA1 detected on multigene panel testing in individuals with gastric or breast cancer. *Genet Med* 22: 840-846

Clouet A, Narbonne P (2023) Regulation of Stem Cell Proliferation by p38 MAPK Signaling. *Med Discoveries* 2: 1096

Colaiacono MP (2006) The many facets of SC function during *C. elegans* meiosis. *Chromosoma* 115: 195-211

Colaiacono MP, MacQueen AJ, Martinez-Perez E, McDonald K, Adamo A, La Volpe A, Villeneuve AM (2003) Synaptonemal complex assembly in *C. elegans* is dispensable for loading strand-exchange proteins but critical for proper completion of recombination. *Dev Cell* 5: 463-474

Corsi AK, Wightman B, Chalfie M (2015) A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*: 1-31

Couillault C, Pujol N, Reboul J, Sabatier L, Guichou JF, Kohara Y, Ewbank JJ (2004) TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat Immunol* 5: 488-494

Couteau F, Zetka M (2011) DNA damage during meiosis induces chromatin remodeling and synaptonemal complex disassembly. *Dev Cell* 20: 353-363

Crittenden SL, Bernstein DS, Bachorik JL, Thompson BE, Gallegos M, Petcherski AG, Moulder G, Barstead R, Wickens M, Kimble J (2002) A conserved RNA-binding protein controls germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 417: 660-663

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

Czech VL, O'Connor LC, Philippon B, Norman E, Byrne AB (2023) TIR-1/SARM1 inhibits axon regeneration and promotes axon degeneration. *Elife* 12

Dawes HE, Berlin DS, Lapidus DM, Nusbaum C, Davis TL, Meyer BJ (1999) Dosage compensation proteins targeted to X chromosomes by a determinant of hermaphrodite fate. *Science* 284: 1800-1804

Deng J, Chaudhari AM, Gagné O, Roy V, Dufour B, Martel P-O, Simard MJ, Narbonne P (2025) DAF-18/PTEN prevents oocyte wastage in spermless *C. elegans* hermaphrodites by blocking spermatheca neck dilation through RHO-1/RhoA disinhibition. *bioRxiv*: 2025.2009.2016.676617

Dernburg AF, McDonald K, Moulder G, Barstead R, Dresser M, Villeneuve AM (1998) Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 94: 387-398

Detwiler MR, Reuben M, Li X, Rogers E, Lin R (2001) Two zinc finger proteins, OMA-1 and OMA-2, are redundantly required for oocyte maturation in *C. elegans*. *Dev Cell* 1: 187-199

Dickinson DJ, Pani AM, Heppert JK, Higgins CD, Goldstein B (2015) Streamlined Genome Engineering with a Self-Excising Drug Selection Cassette. *Genetics* 200: 1035-1049

Doitsidou M, Poole RJ, Sarin S, Bigelow H, Hobert O (2010) *C. elegans* mutant identification with a one-step whole-genome-sequencing and SNP mapping strategy. *PLoS One* 5: e15435

Doniach T (1986) Activity of the sex-determining gene *tra-2* is modulated to allow spermatogenesis in the *C. elegans* hermaphrodite. *Genetics* 114: 53-76

Doniach T, Hodgkin J (1984) A sex-determining gene, *fem-1*, required for both male and hermaphrodite development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 106: 223-235

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

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

Edgley ML, Baillie DL, Riddle DL, Rose AM (2006) Genetic balancers. *WormBook*: 1-32

Ellis R, Schedl T (2007) Sex determination in the germ line. *WormBook*: 1-13

Ellis RE, Kimble J (1995) The fog-3 gene and regulation of cell fate in the germ line of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 139: 561-577

Essuman K, Summers DW, Sasaki Y, Mao X, DiAntonio A, Milbrandt J (2017) The SARM1 Toll/Interleukin-1 Receptor Domain Possesses Intrinsic NAD(+) Cleavage Activity that Promotes Pathological Axonal Degeneration. *Neuron* 93: 1334-1343 e1335

Fewings E, Larionov A, Redman J, Goldgraben MA, Scarth J, Richardson S, Brewer C, Davidson R, Ellis I, Evans DG *et al* (2018) Germline pathogenic variants in PALB2 and other cancer-predisposing genes in families with hereditary diffuse gastric cancer without CDH1 mutation: a whole-exome sequencing study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 3: 489-498

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

Fitzgerald K, Wilkinson HA, Greenwald I (1993) glp-1 can substitute for lin-12 in specifying cell fate decisions in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 119: 1019-1027

Fox PM, Schedl T (2015) Analysis of Germline Stem Cell Differentiation Following Loss of GLP-1 Notch Activity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 201: 167-184

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

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

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

Fuchs SY, Dolan L, Davis RJ, Ronai Z (1996) Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene* 13: 1531-1535

Furuta T, Joo HJ, Trimmer KA, Chen SY, Arur S (2018) GSK-3 promotes S-phase entry and progression in *C. elegans* germline stem cells to maintain tissue output. *Development* 145

Gallegos M, Ahringer J, Crittenden S, Kimble J (1998) Repression by the 3' UTR of fem-3, a sex-determining gene, relies on a ubiquitous mog-dependent control in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 17: 6337-6347

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

Gaston D, Hansford S, Oliveira C, Nightingale M, Pinheiro H, Macgillivray C, Kaurah P, Rideout AL, Steele P, Soares G *et al* (2014) Germline mutations in MAP3K6 are associated with familial gastric cancer. *PLoS Genet* 10: e1004669

Gaudet J, VanderElst I, Spence AM (1996) Post-transcriptional regulation of sex determination in *Caenorhabditis elegans*: widespread expression of the sex-determining gene fem-1 in both sexes. *Mol Biol Cell* 7: 1107-1121

Gendelman R, Xing H, Mirzoeva OK, Sarde P, Curtis C, Feiler HS, McDonagh P, Gray JW, Khalil I, Korn WM (2017) Bayesian Network Inference Modeling Identifies TRIB1 as a Novel Regulator of Cell-Cycle Progression and Survival in Cancer Cells. *Cancer Res* 77: 1575-1585

Gerdtz J, Brace EJ, Sasaki Y, DiAntonio A, Milbrandt J (2015) SARM1 activation triggers axon degeneration locally via NAD(+) destruction. *Science* 348: 453-457

Gerke P, Keshet A, Mertenskötter A, Paul RJ (2014) The JNK-like MAPK KGB-1 of *Caenorhabditis elegans* promotes reproduction, lifespan, and gene expressions for protein

biosynthesis and germline homeostasis but interferes with hyperosmotic stress tolerance. *Cell Physiol Biochem* 34: 1951-1973

Gligoris T, Lowe J (2016) Structural Insights into Ring Formation of Cohesin and Related Smc Complexes. *Trends Cell Biol* 26: 680-693

Goodwin EB, Okkema PG, Evans TC, Kimble J (1993) Translational regulation of tra-2 by its 3' untranslated region controls sexual identity in *C. elegans*. *Cell* 75: 329-339

Goodyer W, Kaitna S, Couteau F, Ward JD, Boulton SJ, Zetka M (2008) HTP-3 links DSB formation with homolog pairing and crossing over during *C. elegans* meiosis. *Dev Cell* 14: 263-274

Govindan JA, Nadarajan S, Kim S, Starich TA, Greenstein D (2009) Somatic cAMP signaling regulates MSP-dependent oocyte growth and meiotic maturation in *C. elegans*. *Development* 136: 2211-2221

Graham PL, Kimble J (1993) The mog-1 gene is required for the switch from spermatogenesis to oogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 133: 919-931

Graham PL, Schedl T, Kimble J (1993) More mog genes that influence the switch from spermatogenesis to oogenesis in the hermaphrodite germ line of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Genet* 14: 471-484

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

Greenstein D (2005) Control of oocyte meiotic maturation and fertilization. *WormBook*: 1-12

Greenstein D, Hird S, Plasterk RH, Andachi Y, Kohara Y, Wang B, Finney M, Ruvkun G (1994) Targeted mutations in the *Caenorhabditis elegans* POU homeo box gene *ceh-18* cause defects in oocyte cell cycle arrest, gonad migration, and epidermal differentiation. *Genes Dev* 8: 1935-1948

Grethe S, Porn-Ares MI (2006) p38 MAPK regulates phosphorylation of Bad via PP2A-dependent suppression of the MEK1/2-ERK1/2 survival pathway in TNF- α induced endothelial apoptosis. *Cell Signal* 18: 531-540

Grosshans J, Wieschaus E (2000) A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell* 101: 523-531

Gruden G, Zonca S, Hayward A, Thomas S, Maestrini S, Gnudi L, Viberti GC (2000) Mechanical stretch-induced fibronectin and transforming growth factor-beta1 production in human mesangial cells is p38 mitogen-activated protein kinase-dependent. *Diabetes* 49: 655-661

Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, Scoular R, Miller A, Reeve AE (1998) E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 392: 402-405

Gumienny TL, Lambie E, Hartweg E, Horvitz HR, Hengartner MO (1999) Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* 126: 1011-1022

Gupta J, del Barco Barrantes I, Igea A, Sakellariou S, Pateras IS, Gorgoulis VG, Nebreda AR (2014) Dual function of p38 α MAPK in colon cancer: suppression of colitis-associated tumor initiation but requirement for cancer cell survival. *Cancer Cell* 25: 484-500

Hall DH, Winfrey VP, Blaeuer G, Hoffman LH, Furuta T, Rose KL, Hobert O, Greenstein D (1999) Ultrastructural features of the adult hermaphrodite gonad of *Caenorhabditis elegans*: relations between the germ line and soma. *Dev Biol* 212: 101-123

Hansen D, Hubbard EJ, Schedl T (2004a) Multi-pathway control of the proliferation versus meiotic development decision in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Dev Biol* 268: 342-357

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

Harper NC, Rillo R, Jover-Gil S, Assaf ZJ, Bhalla N, Dernburg AF (2011) Pairing centers recruit a Polo-like kinase to orchestrate meiotic chromosome dynamics in *C. elegans*. *Dev Cell* 21: 934-947

Hartwell LH, Weinert TA (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634

Hayashi M, Chin GM, Villeneuve AM (2007) *C. elegans* germ cells switch between distinct modes of double-strand break repair during meiotic prophase progression. *PLoS Genet* 3: e191

He D, Wu H, Xiang J, Ruan X, Peng P, Ruan Y, Chen YG, Wang Y, Yu Q, Zhang H *et al* (2020) Gut stem cell aging is driven by mTORC1 via a p38 MAPK-p53 pathway. *Nat Commun* 11: 37

Henderson ST, Gao D, Christensen S, Kimble J (1997) Functional domains of LAG-2, a putative signaling ligand for LIN-12 and GLP-1 receptors in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 8: 1751-1762

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

Herman RK, Kari CK (1989) Recombination between small X chromosome duplications and the X chromosome in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 121: 723-737

Hillers KJ, Jantsch V, Martinez-Perez E, Yanowitz JL (2017) Meiosis. *WormBook* 2017: 1-43

Hirsh D, Oppenheim D, Klass M (1976) Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 49: 200-219

Hodgkin J (1983a) Male Phenotypes and Mating Efficiency in CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics* 103: 43-64

Hodgkin J (1983b) Two types of sex determination in a nematode. *Nature* 304: 267-268

Hodgkin J (1986) Sex determination in the nematode *C. elegans*: analysis of tra-3 suppressors and characterization of fem genes. *Genetics* 114: 15-52

Hodgkin J (1987) A genetic analysis of the sex-determining gene, tra-1, in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 1: 731-745

Hodgkin J, Horvitz HR, Brenner S (1979) Nondisjunction Mutants of the Nematode CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics* 91: 67-94

Hoffman L, Jensen CC, Yoshigi M, Beckerle M (2017) Mechanical signals activate p38 MAPK pathway-dependent reinforcement of actin via mechanosensitive HspB1. *Mol Biol Cell* 28: 2661-2675

Hsu YC, Pasolli HA, Fuchs E (2011) Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle. *Cell* 144: 92-105

Hubbard EJ, Greenstein D (2005) Introduction to the germ line. *WormBook*: 1-4

Hubbard EJA, Schedl T (2019) Biology of the *Caenorhabditis elegans* Germline Stem Cell System. *Genetics* 213: 1145-1188

Hunter CP, Wood WB (1990) The tra-1 gene determines sexual phenotype cell-autonomously in *C. elegans*. *Cell* 63: 1193-1204

Inoue H, Hisamoto N, An JH, Oliveira RP, Nishida E, Blackwell TK, Matsumoto K (2005) The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes Dev* 19: 2278-2283

Italiano JE, Jr., Roberts TM, Stewart M, Fontana CA (1996) Reconstitution in vitro of the motile apparatus from the amoeboid sperm of *Ascaris* shows that filament assembly and bundling move membranes. *Cell* 84: 105-114

Ito K, McGhee JD (1987) Parental DNA strands segregate randomly during embryonic development of *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 49: 329-336

Iwasaki K, McCarter J, Francis R, Schedl T (1996) *emo-1*, a *Caenorhabditis elegans* Sec61p gamma homologue, is required for oocyte development and ovulation. *J Cell Biol* 134: 699-714

Jan E, Motzny CK, Graves LE, Goodwin EB (1999) The STAR protein, GLD-1, is a translational regulator of sexual identity in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 18: 258-269

Jansson HB (1994) Adhesion of Conidia of *Drechmeria coniospora* to *Caenorhabditis elegans* Wild Type and Mutants. *J Nematol* 26: 430-435

Jantsch V, Tang L, Pasierbek P, Penkner A, Nayak S, Baudrimont A, Schedl T, Gartner A, Loidl J (2007) *Caenorhabditis elegans* *prom-1* is required for meiotic prophase progression and homologous chromosome pairing. *Mol Biol Cell* 18: 4911-4920

Jiang H, Patel PH, Kohlmaier A, Grenley MO, McEwen DG, Edgar BA (2009) Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut. *Cell* 137: 1343-1355

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

Johnston EF, Gillis TE (2020) Short-term cyclical stretch phosphorylates p38 and ERK1/2 MAPKs in cultured fibroblasts from the hearts of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biol Open* 9

Jones AR, Francis R, Schedl T (1996) GLD-1, a cytoplasmic protein essential for oocyte differentiation, shows stage- and sex-specific expression during *Caenorhabditis elegans* germline development. *Dev Biol* 180: 165-183

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

Jordan KC, Schaeffer V, Fischer KA, Gray EE, Ruohola-Baker H (2006) Notch signaling through tramtrack bypasses the mitosis promoting activity of the JNK pathway in the mitotic-to-endocycle transition of *Drosophila* follicle cells. *BMC Dev Biol* 6: 16

Joseph BB, Blouin NA, Fay DS (2018) Use of a Sibling Subtraction Method for Identifying Causal Mutations in *Caenorhabditis elegans* by Whole-Genome Sequencing. *G3 (Bethesda)* 8: 669-678

Jungkamp AC, Stoeckius M, Mecnas D, Grun D, Mastrobuoni G, Kempa S, Rajewsky N (2011) In vivo and transcriptome-wide identification of RNA binding protein target sites. *Mol Cell* 44: 828-840

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

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

Kao G, Tuck S, Baillie D, Sundaram MV (2004) *C. elegans* SUR-6/PR55 cooperates with LET-92/protein phosphatase 2A and promotes Raf activity independently of inhibitory Akt phosphorylation sites. *Development* 131: 755-765

Kariya K, Bui YK, Gao X, Sternberg PW, Kataoka T (2004) Phospholipase Cepsilon regulates ovulation in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 274: 201-210

Ke H, Harris R, Coloff JL, Jin JY, Leshin B, Miliani de Marval P, Tao S, Rathmell JC, Hall RP, Zhang JY (2010) The c-Jun NH2-terminal kinase 2 plays a dominant role in human epidermal neoplasia. *Cancer Res* 70: 3080-3088

Kershner AM, Kimble J (2010) Genome-wide analysis of mRNA targets for *Caenorhabditis elegans* FBF, a conserved stem cell regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3936-3941

Kershner AM, Shin H, Hansen TJ, Kimble J (2014) Discovery of two GLP-1/Notch target genes that account for the role of GLP-1/Notch signaling in stem cell maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 3739-3744

Killian DJ, Hubbard EJ (2005) *Caenorhabditis elegans* germline patterning requires coordinated development of the somatic gonadal sheath and the germ line. *Dev Biol* 279: 322-335

Kim DH, Liberati NT, Mizuno T, Inoue H, Hisamoto N, Matsumoto K, Ausubel FM (2004) Integration of *Caenorhabditis elegans* MAPK pathways mediating immunity and stress resistance by MEK-1 MAPK kinase and VHP-1 MAPK phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10990-10994

Kim KW, Thakur N, Piggott CA, Omi S, Polanowska J, Jin Y, Pujol N (2016) Coordinated inhibition of C/EBP by Tribbles in multiple tissues is essential for *Caenorhabditis elegans* development. *BMC Biol* 14: 104

Kim S, Govindan JA, Tu ZJ, Greenstein D (2012) SACY-1 DEAD-Box helicase links the somatic control of oocyte meiotic maturation to the sperm-to-oocyte switch and gamete maintenance in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 192: 905-928

Kim Y, Rosenberg SC, Kugel CL, Kostow N, Rog O, Davydov V, Su TY, Dernburg AF, Corbett KD (2014) The chromosome axis controls meiotic events through a hierarchical assembly of HORMA domain proteins. *Dev Cell* 31: 487-502

Kimble J, Crittenden SL (2005) Germline proliferation and its control. *WormBook*: 1-14

Kimble J, Edgar L, Hirsh D (1984) Specification of male development in *Caenorhabditis elegans*: the fem genes. *Dev Biol* 105: 234-239

Kimble J, Hirsh D (1979) The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 70: 396-417

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

Kimble J, Simpson P (1997) The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 333-361

Kimble JE, White JG (1981) On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 81: 208-219

Kipreos ET, Gohel SP, Hedgecock EM (2000) The *C. elegans* F-box/WD-repeat protein LIN-23 functions to limit cell division during development. *Development* 127: 5071-5082

Kipreos ET, Lander LE, Wing JP, He WW, Hedgecock EM (1996) cul-1 is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family. *Cell* 85: 829-839

Kodoyianni V, Maine EM, Kimble J (1992) Molecular basis of loss-of-function mutations in the glp-1 gene of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 3: 1199-1213

Kook SH, Lee HJ, Chung WT, Hwang IH, Lee SA, Kim BS, Lee JC (2008) Cyclic mechanical stretch stimulates the proliferation of C2C12 myoblasts and inhibits their differentiation via prolonged activation of p38 MAPK. *Mol Cells* 25: 479-486

Kostic I, Li S, Roy R (2003) cki-1 links cell division and cell fate acquisition in the *C. elegans* somatic gonad. *Dev Biol* 263: 242-252

Kraemer B, Crittenden S, Gallegos M, Moulder G, Barstead R, Kimble J, Wickens M (1999) NANOS-3 and FBF proteins physically interact to control the sperm-oocyte switch in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 9: 1009-1018

Kumar A, Chaudhry I, Reid MB, Boriek AM (2002) Distinct signaling pathways are activated in response to mechanical stress applied axially and transversely to skeletal muscle fibers. *J Biol Chem* 277: 46493-46503

Kumar V, Behera R, Lohite K, Karnik S, Kundu GC (2010) p38 kinase is crucial for osteopontin-induced furin expression that supports cervical cancer progression. *Cancer Res* 70: 10381-10391

Kuznicki KA, Smith PA, Leung-Chiu WM, Estevez AO, Scott HC, Bennett KL (2000) Combinatorial RNA interference indicates GLH-4 can compensate for GLH-1; these two P granule components are critical for fertility in *C. elegans*. *Development* 127: 2907-2916

Labella S, Woglar A, Jantsch V, Zetka M (2011) Polo kinases establish links between meiotic chromosomes and cytoskeletal forces essential for homolog pairing. *Dev Cell* 21: 948-958

Lal H, Verma SK, Smith M, Guleria RS, Lu G, Foster DM, Dostal DE (2007) Stretch-induced MAP kinase activation in cardiac myocytes: differential regulation through beta1-integrin and focal adhesion kinase. *J Mol Cell Cardiol* 43: 137-147

Lam N, Chesney MA, Kimble J (2006) Wnt signaling and CEH-22/tinman/Nkx2.5 specify a stem cell niche in *C. elegans*. *Curr Biol* 16: 287-295

Lambie EJ, Kimble J (1991) Two homologous regulatory genes, *lin-12* and *glp-1*, have overlapping functions. *Development* 112: 231-240

Lamont LB, Crittenden SL, Bernstein D, Wickens M, Kimble J (2004) FBF-1 and FBF-2 regulate the size of the mitotic region in the *C. elegans* germline. *Dev Cell* 7: 697-707

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

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

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

Lee MH, Schedl T (2010) *C. elegans* star proteins, GLD-1 and ASD-2, regulate specific RNA targets to control development. *Adv Exp Med Biol* 693: 106-122

Lemmens BB, Johnson NM, Tijsterman M (2013) COM-1 promotes homologous recombination during *Caenorhabditis elegans* meiosis by antagonizing Ku-mediated non-homologous end joining. *PLoS Genet* 9: e1003276

Letunic I, Bork P (2025) SMART v10: three decades of the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res*

Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, Vidalain PO, Han JD, Chesneau A, Hao T *et al* (2004) A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* 303: 540-543

Liang F, Gardner DG (1999) Mechanical strain activates BNP gene transcription through a p38/NF-kappaB-dependent mechanism. *J Clin Invest* 104: 1603-1612

Liberati NT, Fitzgerald KA, Kim DH, Feinbaum R, Golenbock DT, Ausubel FM (2004) Requirement for a conserved Toll/interleukin-1 resistance domain protein in the *Caenorhabditis elegans* immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6593-6598

Liu L, Ruediger C, Shapira M (2018) Integration of Stress Signaling in *Caenorhabditis elegans* Through Cell-Nonautonomous Contributions of the JNK Homolog KGB-1. *Genetics* 210: 1317-1328

Liu Q, Hofmann PA (2004) Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H2204-2212

Liu WH, Chen YJ, Cheng TL, Lin SR, Chang LS (2013) Cross talk between p38MAPK and ERK is mediated through MAPK-mediated protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha and MAPK phosphatase-1 expression in human leukemia U937 cells. *Cell Signal* 25: 1845-1851

Lobert VH, Brech A, Pedersen NM, Wesche J, Oppelt A, Malerod L, Stenmark H (2010) Ubiquitination of alpha 5 beta 1 integrin controls fibroblast migration through lysosomal degradation of fibronectin-integrin complexes. *Dev Cell* 19: 148-159

MacQueen AJ, Colaiacovo MP, McDonald K, Villeneuve AM (2002) Synapsis-dependent and -independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans*. *Genes Dev* 16: 2428-2442

MacQueen AJ, Villeneuve AM (2001) Nuclear reorganization and homologous chromosome pairing during meiotic prophase require *C. elegans* chk-2. *Genes Dev* 15: 1674-1687

Mao XR, Kaufman DM, Crowder CM (2016) Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase promotes hypoxic survival by activating the mitochondrial unfolded protein response. *Cell Death Dis* 7: e2113

Marin VA, Evans TC (2003) Translational repression of a *C. elegans* Notch mRNA by the STAR/KH domain protein GLD-1. *Development* 130: 2623-2632

Martinez-Limon A, Joaquin M, Caballero M, Posas F, de Nadal E (2020) The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 21

Mashima T, Soma-Nagae T, Migita T, Kinoshita R, Iwamoto A, Yuasa T, Yonese J, Ishikawa Y, Seimiya H (2014) TRIB1 supports prostate tumorigenesis and tumor-propagating cell survival by regulation of endoplasmic reticulum chaperone expression. *Cancer Res* 74: 4888-4897

Mata J, Curado S, Ephrussi A, Rorth P (2000) Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell* 101: 511-522

McCarter J, Bartlett B, Dang T, Schedl T (1997) 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

McCarter J, Bartlett B, Dang T, Schedl T (1999) On the control of oocyte meiotic maturation and ovulation in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 205: 111-128

McEwan DL, Feinbaum RL, Stroustrup N, Haas W, Conery AL, Anselmo A, Sadreyev R, Ausubel FM (2016) Tribbles ortholog NIPI-3 and bZIP transcription factor CEBP-1 regulate a *Caenorhabditis elegans* intestinal immune surveillance pathway. *BMC Biol* 14: 105

McKim KS, Howell AM, Rose AM (1988) The effects of translocations on recombination frequency in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 120: 987-1001

McMillan HD, Papachristou EK, Hazlett J, Omarjee S, Carroll JS, Black MA, Mace PD, Dunbier AK (2023) TRIB1 modulates transcriptional programming in breast cancer cells to regulate cell proliferation. *bioRxiv*: 2023.2007.2006.547928

Mehra A, Gaudet J, Heck L, Kuwabara PE, Spence AM (1999) Negative regulation of male development in *Caenorhabditis elegans* by a protein-protein interaction between TRA-2A and FEM-3. *Genes Dev* 13: 1453-1463

Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V (1991) Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* 10: 3959-3970

Mendez R, Richter JD (2001) Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 521-529

Merritt C, Rasoloson D, Ko D, Seydoux G (2008) 3' UTRs are the primary regulators of gene expression in the *C. elegans* germline. *Curr Biol* 18: 1476-1482

Merritt C, Seydoux G (2010) The Puf RNA-binding proteins FBF-1 and FBF-2 inhibit the expression of synaptonemal complex proteins in germline stem cells. *Development* 137: 1787-1798

Meyer BJ (2000) Sex in the worm counting and compensating X-chromosome dose. *Trends Genet* 16: 247-253

Michaelson D, Korta DZ, Capua Y, Hubbard EJ (2010) Insulin signaling promotes germline proliferation in *C. elegans*. *Development* 137: 671-680

Miller LM, Plenefisch JD, Casson LP, Meyer BJ (1988) *xol-1*: a gene that controls the male modes of both sex determination and X chromosome dosage compensation in *C. elegans*. *Cell* 55: 167-183

Miller MA, Nguyen VQ, Lee MH, Kosinski M, Schedl T, Caprioli RM, Greenstein D (2001) A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation. *Science* 291: 2144-2147

Miller MA, Ruest PJ, Kosinski M, Hanks SK, Greenstein D (2003) An Eph receptor sperm-sensing control mechanism for oocyte meiotic maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 17: 187-200

Millonigg S, Minasaki R, Nusch M, Novak J, Eckmann CR (2014) GLD-4-mediated translational activation regulates the size of the proliferative germ cell pool in the adult *C. elegans* germ line. *PLoS Genet* 10: e1004647

Mizuno T, Hisamoto N, Terada T, Kondo T, Adachi M, Nishida E, Kim DH, Ausubel FM, Matsumoto K (2004) The *Caenorhabditis elegans* MAPK phosphatase VHP-1 mediates a novel JNK-like signaling pathway in stress response. *EMBO J* 23: 2226-2234

Mohammad A, Vanden Broek K, Wang C, Daryabeigi A, Jantsch V, Hansen D, Schedl T (2018) Initiation of Meiotic Development Is Controlled by Three Post-transcriptional Pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 209: 1197-1224

Mondal BC, Mukherjee T, Mandal L, Evans CJ, Sinenko SA, Martinez-Agosto JA, Banerjee U (2011) Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. *Cell* 147: 1589-1600

Morale MG, da Silva Abjaude W, Silva AM, Villa LL, Boccardo E (2018) HPV-transformed cells exhibit altered HMGB1-TLR4/MyD88-SARM1 signaling axis. *Sci Rep* 8: 3476

Morale MG, Tamura RE, Cintra R, Araujo NM, Villa LL (2022) TLR4 and SARM1 modulate survival and chemoresistance in an HPV-positive cervical cancer cell line. *Sci Rep* 12: 6714

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

Myers CD, Goh PY, Allen TS, Bucher EA, Bogaert T (1996) Developmental genetic analysis of troponin T mutations in striated and nonstriated muscle cells of *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 132: 1061-1077

Nabeshima K, Mlynarczyk-Evans S, Villeneuve AM (2011) Chromosome painting reveals asynaptic full alignment of homologs and HIM-8-dependent remodeling of X chromosome territories during *Caenorhabditis elegans* meiosis. *PLoS Genet* 7: e1002231

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

Nakata K, Abrams B, Grill B, Goncharov A, Huang X, Chisholm AD, Jin Y (2005) Regulation of a DLK-1 and p38 MAP kinase pathway by the ubiquitin ligase RPM-1 is required for presynaptic development. *Cell* 120: 407-420

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

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

Narbonne P, Maddox PS, Labbe JC (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: e1006738

Narbonne P, Roy R (2006a) Inhibition of germline proliferation during *C. elegans* dauer development requires PTEN, LKB1 and AMPK signalling. *Development* 133: 611-619

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

Nayak S, Santiago FE, Jin H, Lin D, Schedl T, Kipreos ET (2002) The *Caenorhabditis elegans* Skp1-related gene family: diverse functions in cell proliferation, morphogenesis, and meiosis. *Curr Biol* 12: 277-287

Nix P, Hammarlund M, Hauth L, Lachnit M, Jorgensen EM, Bastiani M (2014) Axon regeneration genes identified by RNAi screening in *C. elegans*. *J Neurosci* 34: 629-645

Nix P, Hisamoto N, Matsumoto K, Bastiani M (2011) Axon regeneration requires coordinate activation of p38 and JNK MAPK pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 10738-10743

Nousch M, Minasaki R, Eckmann CR (2017) Polyadenylation is the key aspect of GLD-2 function in *C. elegans*. *RNA* 23: 1180-1187

Nousch M, Yeroslaviz A, Habermann B, Eckmann CR (2014) The cytoplasmic poly(A) polymerases GLD-2 and GLD-4 promote general gene expression via distinct mechanisms. *Nucleic Acids Res* 42: 11622-11633

Ogura K, Okada T, Mitani S, Gengyo-Ando K, Baillie DL, Kohara Y, Goshima Y (2010) Protein phosphatase 2A cooperates with the autophagy-related kinase UNC-51 to regulate axon guidance in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 137: 1657-1667

Ono K, Ono S (2004) Tropomyosin and troponin are required for ovarian contraction in the *Caenorhabditis elegans* reproductive system. *Mol Biol Cell* 15: 2782-2793

Orsborn AM, Li W, McEwen TJ, Mizuno T, Kuzmin E, Matsumoto K, Bennett KL (2007) GLH-1, the *C. elegans* P granule protein, is controlled by the JNK KGB-1 and by the COP9 subunit CSN-5. *Development* 134: 3383-3392

Osterloh JM, Yang J, Rooney TM, Fox AN, Adalbert R, Powell EH, Sheehan AE, Avery MA, Hackett R, Logan MA *et al* (2012) dSarm/Sarm1 is required for activation of an injury-induced axon death pathway. *Science* 337: 481-484

Padmanabhan S, Mukhopadhyay A, Narasimhan SD, Tesz G, Czech MP, Tissenbaum HA (2009) A PP2A regulatory subunit regulates *C. elegans* insulin/IGF-1 signaling by modulating AKT-1 phosphorylation. *Cell* 136: 939-951

Page BD, Guedes S, Waring D, Priess JR (2001) The *C. elegans* E2F- and DP-related proteins are required for embryonic asymmetry and negatively regulate Ras/MAPK signaling. *Mol Cell* 7: 451-460

Pal S, Lant B, Yu B, Tian R, Tong J, Krieger JR, Moran MF, Gingras AC, Derry WB (2017) CCM-3 Promotes *C. elegans* Germline Development by Regulating Vesicle Trafficking Cytokinesis and Polarity. *Curr Biol* 27: 868-876

Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 349-404

Pasierbek P, Fodermayr M, Jantsch V, Jantsch M, Schweizer D, Loidl J (2003) The *Caenorhabditis elegans* SCC-3 homologue is required for meiotic synapsis and for proper chromosome disjunction in mitosis and meiosis. *Exp Cell Res* 289: 245-255

Pasierbek P, Jantsch M, Melcher M, Schleiffer A, Schweizer D, Loidl J (2001) A *Caenorhabditis elegans* cohesion protein with functions in meiotic chromosome pairing and disjunction. *Genes Dev* 15: 1349-1360

Pastuhov SI, Fujiki K, Nix P, Kanao S, Bastiani M, Matsumoto K, Hisamoto N (2012) Endocannabinoid-G α signalling inhibits axon regeneration in *Caenorhabditis elegans* by antagonizing G α lpha-PKC-JNK signalling. *Nat Commun* 3: 1136

Pastuhov SI, Hisamoto N, Matsumoto K (2015) MAP kinase cascades regulating axon regeneration in *C. elegans*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 91: 63-75

Pekar O, Ow MC, Hui KY, Noyes MB, Hall SE, Hubbard EJA (2017) Linking the environment, DAF-7/TGF β signaling and LAG-2/DSL ligand expression in the germline stem cell niche. *Development* 144: 2896-2906

Pepper AS, Killian DJ, Hubbard EJ (2003) Genetic analysis of *Caenorhabditis elegans* glp-1 mutants suggests receptor interaction or competition. *Genetics* 163: 115-132

Perry MD, Li W, Trent C, Robertson B, Fire A, Hageman JM, Wood WB (1993) Molecular characterization of the her-1 gene suggests a direct role in cell signaling during *Caenorhabditis elegans* sex determination. *Genes Dev* 7: 216-228

Petalcorin MI, Sandall J, Wigley DB, Boulton SJ (2006) CeBRC-2 stimulates D-loop formation by RAD-51 and promotes DNA single-strand annealing. *J Mol Biol* 361: 231-242

Peterson ND, Ico JD, Salisbury JE, Rodriguez T, Thompson PR, Pukkila-Worley R (2022) Pathogen infection and cholesterol deficiency activate the *C. elegans* p38 immune pathway through a TIR-1/SARM1 phase transition. *Elife* 11

Phillips CM, Dernburg AF (2006) A family of zinc-finger proteins is required for chromosome-specific pairing and synapsis during meiosis in *C. elegans*. *Dev Cell* 11: 817-829

Phillips CM, Meng X, Zhang L, Chretien JH, Urnov FD, Dernburg AF (2009) Identification of chromosome sequence motifs that mediate meiotic pairing and synapsis in *C. elegans*. *Nat Cell Biol* 11: 934-942

Phillips CM, Wong C, Bhalla N, Carlton PM, Weiser P, Meneely PM, Dernburg AF (2005) HIM-8 binds to the X chromosome pairing center and mediates chromosome-specific meiotic synapsis. *Cell* 123: 1051-1063

Pilgrim D, McGregor A, Jackle P, Johnson T, Hansen D (1995) The *C. elegans* sex-determining gene fem-2 encodes a putative protein phosphatase. *Mol Biol Cell* 6: 1159-1171

Priess JR (2005) Notch signaling in the *C. elegans* embryo. *WormBook*: 1-16

Pujol N, Cypowyj S, Ziegler K, Millet A, Astrain A, Goncharov A, Jin Y, Chisholm AD, Ewbank JJ (2008) Distinct innate immune responses to infection and wounding in the *C. elegans* epidermis. *Curr Biol* 18: 481-489

Qadota H, Inoue M, Hikita T, Koppen M, Hardin JD, Amano M, Moerman DG, Kaibuchi K (2007) Establishment of a tissue-specific RNAi system in *C. elegans*. *Gene* 400: 166-173

Rhind NR, Miller LM, Kopczynski JB, Meyer BJ (1995) xol-1 acts as an early switch in the *C. elegans* male/hermaphrodite decision. *Cell* 80: 71-82

Robinson-Thiewes S, Dufour B, Martel PO, Lechasseur X, Brou AAD, Roy V, Chen Y, Kimble J, Narbonne P (2021) Non-autonomous regulation of germline stem cell proliferation by somatic MPK-1/MAPK activity in *C. elegans*. *Cell Rep* 35: 109162

Rose AM, Baillie DL, Curran J (1984) Meiotic pairing behavior of two free duplications of linkage group I in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Gen Genet* 195: 52-56

Rose KL, Winfrey VP, Hoffman LH, Hall DH, Furuta T, Greenstein D (1997) The POU gene ceh-18 promotes gonadal sheath cell differentiation and function required for meiotic maturation and ovulation in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 192: 59-77

Rosenbluth RE, Baillie DL (1981) The genetic analysis of a reciprocal translocation, eT1(III; V), in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 99: 415-428

Rosenquist TA, Kimble J (1988) Molecular cloning and transcript analysis of fem-3, a sex-determination gene in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 2: 606-616

Rothlisberger B, Heizmann M, Bargetzi MJ, Huber AR (2007) TRIB1 overexpression in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 176: 58-60

Runkel ED, Liu S, Baumeister R, Schulze E (2013) Surveillance-activated defenses block the ROS-induced mitochondrial unfolded protein response. *PLoS Genet* 9: e1003346

Sabapathy K, Hochedlinger K, Nam SY, Bauer A, Karin M, Wagner EF (2004) Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell* 15: 713-725

Sabapathy K, Wagner EF (2004) JNK2: a negative regulator of cellular proliferation. *Cell Cycle* 3: 1520-1523

Sagasti A, Hisamoto N, Hyodo J, Tanaka-Hino M, Matsumoto K, Bargmann CI (2001) The CaMKII UNC-43 activates the MAPKKK NSY-1 to execute a lateral signaling decision required for asymmetric olfactory neuron fates. *Cell* 105: 221-232

Sanchez AD, Branon TC, Cote LE, Papagiannakis A, Liang X, Pickett MA, Shen K, Jacobs-Wagner C, Ting AY, Feldman JL (2021) Proximity labeling reveals non-centrosomal microtubule-organizing center components required for microtubule growth and localization. *Curr Biol* 31: 3586-3600 e3511

Sato A, Isaac B, Phillips CM, Rillo R, Carlton PM, Wynne DJ, Kasad RA, Dernburg AF (2009) Cytoskeletal forces span the nuclear envelope to coordinate meiotic chromosome pairing and synapsis. *Cell* 139: 907-919

Schedl T, Kimble J (1988) fog-2, a germ-line-specific sex determination gene required for hermaphrodite spermatogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 119: 43-61

Schlaitz AL, Srayko M, Dammermann A, Quintin S, Wielsch N, MacLeod I, de Robillard Q, Zinke A, Yates JR, 3rd, Muller-Reichert T *et al* (2007) The *C. elegans* RSA complex localizes protein phosphatase 2A to centrosomes and regulates mitotic spindle assembly. *Cell* 128: 115-127

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

Schramek D, Kotsinas A, Meixner A, Wada T, Elling U, Pospisilik JA, Neely GG, Zwick RH, Sigl V, Forni G *et al* (2011) The stress kinase MKK7 couples oncogenic stress to p53 stability and tumor suppression. *Nat Genet* 43: 212-219

Sega GA (1984) A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutat Res* 134: 113-142

Segal SP, Graves LE, Verheyden J, Goodwin EB (2001) RNA-Regulated TRA-1 nuclear export controls sexual fate. *Dev Cell* 1: 539-551

Severson AF, Ling L, van Zuylen V, Meyer BJ (2009) The axial element protein HTP-3 promotes cohesin loading and meiotic axis assembly in *C. elegans* to implement the meiotic program of chromosome segregation. *Genes Dev* 23: 1763-1778

Severson AF, Meyer BJ (2014) Divergent kleisin subunits of cohesin specify mechanisms to tether and release meiotic chromosomes. *Elife* 3: e03467

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

Shahrouzi P, Astobiza I, Cortazar AR, Torrano V, Macchia A, Flores JM, Niespolo C, Mendizabal I, Caloto R, Ercilla A *et al* (2020) Genomic and Functional Regulation of TRIB1 Contributes to Prostate Cancer Pathogenesis. *Cancers (Basel)* 12

Shin H, Haupt KA, Kershner AM, Kroll-Conner P, Wickens M, Kimble J (2017) SYGL-1 and LST-1 link niche signaling to PUF RNA repression for stem cell maintenance in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 13: e1007121

Shin H, Kaplan REW, Duong T, Fakieh R, Reiner DJ (2018) Ral Signals through a MAP4 Kinase-p38 MAP Kinase Cascade in *C. elegans* Cell Fate Patterning. *Cell Rep* 24: 2669-2681 e2665

Shivers RP, Kooistra T, Chu SW, Pagano DJ, Kim DH (2009) Tissue-specific activities of an immune signaling module regulate physiological responses to pathogenic and nutritional bacteria in *C. elegans*. *Cell Host Microbe* 6: 321-330

Sieburth DS, Sundaram M, Howard RM, Han M (1999) A PP2A regulatory subunit positively regulates Ras-mediated signaling during *Caenorhabditis elegans* vulval induction. *Genes Dev* 13: 2562-2569

Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RH, Fire A (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107: 465-476

Simmer F, Tijsterman M, Parrish S, Koushika SP, Nonet ML, Fire A, Ahringer J, Plasterk RH (2002) Loss of the putative RNA-directed RNA polymerase RRF-3 makes *C. elegans* hypersensitive to RNAi. *Curr Biol* 12: 1317-1319

Smith P, Leung-Chiu WM, Montgomery R, Orsborn A, Kuznicki K, Gressman-Coberly E, Mutapcic L, Bennett K (2002) The GLH proteins, *Caenorhabditis elegans* P granule components, associate with CSN-5 and KGB-1, proteins necessary for fertility, and with ZYX-1, a predicted cytoskeletal protein. *Dev Biol* 251: 333-347

Smolikov S, Eizinger A, Hurlburt A, Rogers E, Villeneuve AM, Colaiacovo MP (2007a) Synapsis-defective mutants reveal a correlation between chromosome conformation and the mode of double-strand break repair during *Caenorhabditis elegans* meiosis. *Genetics* 176: 2027-2033

Smolikov S, Eizinger A, Schild-Prufert K, Hurlburt A, McDonald K, Engebrecht J, Villeneuve AM, Colaiacovo MP (2007b) SYP-3 restricts synaptonemal complex assembly to bridge paired chromosome axes during meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 176: 2015-2025

Soltanmohammadi N, Wang S, Schumacher B (2022) Somatic PMK-1/p38 signaling links environmental stress to germ cell apoptosis and heritable euploidy. *Nat Commun* 13: 701

Stapleton D, Balan I, Pawson T, Sicheri F (1999) The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization. *Nat Struct Biol* 6: 44-49

Sternberg PW (2005) Vulval development. *WormBook*: 1-28

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

Suh N, Jedamzik B, Eckmann CR, Wickens M, Kimble J (2006) The GLD-2 poly(A) polymerase activates *gld-1* mRNA in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15108-15112

Sulston JE, Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56: 110-156

Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100: 64-119

Sung HY, Guan H, Czibula A, King AR, Eder K, Heath E, Suvarna SK, Dower SK, Wilson AG, Francis SE *et al* (2007) Human tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signaling pathways. *J Biol Chem* 282: 18379-18387

Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC (1999) The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99: 123-132

Tan MW, Mahajan-Miklos S, Ausubel FM (1999) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 715-720

Tanaka-Hino M, Sagasti A, Hisamoto N, Kawasaki M, Nakano S, Ninomiya-Tsuji J, Bargmann CI, Matsumoto K (2002) SEK-1 MAPKK mediates Ca²⁺ signaling to determine neuronal asymmetric development in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Rep* 3: 56-62

Tao L, Yang G, Sun T, Jie T, Zhu C, Yu H, Cheng Y, Yang Z, Xu M, Jiang Y *et al* (2023) Capsaicin receptor TRPV1 maintains quiescence of hepatic stellate cells in the liver via recruitment of SARM1. *J Hepatol* 78: 805-819

Tax FE, Yeagers JJ, Thomas JH (1994) Sequence of *C. elegans* lag-2 reveals a cell-signalling domain shared with Delta and Serrate of *Drosophila*. *Nature* 368: 150-154

Tenenbaum M, Plaisance V, Boutry R, Pawlowski V, Jacovetti C, Sanchez-Parra C, Ezanno H, Bourry J, Beeler N, Pasquetti G *et al* (2021) The Map3k12 (Dlk)/JNK3 signaling pathway is required for pancreatic beta-cell proliferation during postnatal development. *Cell Mol Life Sci* 78: 287-298

Theil K, Herzog M, Rajewsky N (2018) Post-transcriptional Regulation by 3' UTRs Can Be Masked by Regulatory Elements in 5' UTRs. *Cell Rep* 22: 3217-3226

Timmons L, Court DL, Fire A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263: 103-112

Tomasetti C, Li L, Vogelstein B (2017) Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* 355: 1330-1334

Tomasetti C, Vogelstein B (2015) Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 347: 78-81

Trent C, Purnell B, Gavinski S, Hageman J, Chamblin C, Wood WB (1991) Sex-specific transcriptional regulation of the *C. elegans* sex-determining gene *her-1*. *Mech Dev* 34: 43-55

Tse-Kang SY, Wani KA, Peterson ND, Page A, Humphries F, Pukkila-Worley R (2024) Intestinal immunity in *C. elegans* is activated by pathogen effector-triggered aggregation of the guard protein TIR-1 on lysosome-related organelles. *Immunity* 57: 2280-2295 e2286

Tuli MA, Daul A, Schedl T (2018) *Caenorhabditis* nomenclature. *WormBook* 2018: 1-14

Twumasi-Boateng K, Wang TW, Tsai L, Lee KH, Salehpour A, Bhat S, Tan MW, Shapira M (2012) An age-dependent reversal in the protective capacities of JNK signaling shortens *Caenorhabditis elegans* lifespan. *Aging Cell* 11: 659-667

Vadasz I, Dada LA, Briva A, Helenius IT, Sharabi K, Welch LC, Kelly AM, Grzesik BA, Budinger GR, Liu J *et al* (2012) Evolutionary conserved role of c-Jun-N-terminal kinase in CO₂-induced epithelial dysfunction. *PLoS One* 7: e46696

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

Veriepe J, Fossouo L, Parker JA (2015) Neurodegeneration in *C. elegans* models of ALS requires TIR-1/Sarm1 immune pathway activation in neurons. *Nat Commun* 6: 7319

Villeneuve AM (1994) A cis-acting locus that promotes crossing over between X chromosomes in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 136: 887-902

Villeneuve AM, Meyer BJ (1990) The regulatory hierarchy controlling sex determination and dosage compensation in *Caenorhabditis elegans*. *Adv Genet* 27: 117-188

Wagner EF, Nebreda AR (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9: 537-549

Wang HL, Zhang J, Cao SQ, Lagartos-Donate MJ, Zhang SQ, Lautrup S, Hu Z, Lyssiotis CA, Houtkooper RH, Fang EF (2024) A luminescent-based protocol for NAD(+)/NADH detection in *C. elegans*, mice, and human whole blood. *STAR Protoc* 5: 103428

Wang JT, Smith J, Chen BC, Schmidt H, Rasoloson D, Paix A, Lambrus BG, Calidas D, Betzig E, Seydoux G (2014) Regulation of RNA granule dynamics by phosphorylation of serine-rich, intrinsically disordered proteins in *C. elegans*. *Elife* 3: e04591

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

Watt FM, Hogan BL (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287: 1427-1430

Wernig F, Mayr M, Xu Q (2003) Mechanical stretch-induced apoptosis in smooth muscle cells is mediated by beta1-integrin signaling pathways. *Hypertension* 41: 903-911

Wickens M, Bernstein DS, Kimble J, Parker R (2002) A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet* 18: 150-157

Wicks SR, Yeh RT, Gish WR, Waterston RH, Plasterk RH (2001) Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nat Genet* 28: 160-164

Wissmann A, Ingles J, Mains PE (1999) The *Caenorhabditis elegans* mel-11 myosin phosphatase regulatory subunit affects tissue contraction in the somatic gonad and the embryonic epidermis and genetically interacts with the Rac signaling pathway. *Dev Biol* 209: 111-127

Witkowski CM, Bowden GT, Nagle RB, Cress AE (2000) Altered surface expression and increased turnover of the alpha6beta4 integrin in an undifferentiated carcinoma. *Carcinogenesis* 21: 325-330

Wolke U, Jezuit EA, Priess JR (2007) Actin-dependent cytoplasmic streaming in *C. elegans* oogenesis. *Development* 134: 2227-2236

Wright JE, Gaidatzis D, Senften M, Farley BM, Westhof E, Ryder SP, Ciosk R (2011) A quantitative RNA code for mRNA target selection by the germline fate determinant GLD-1. *EMBO J* 30: 533-545

Wu C, Karakuzu O, Garsin DA (2021) Tribbles pseudokinase NIPI-3 regulates intestinal immunity in *Caenorhabditis elegans* by controlling SKN-1/Nrf activity. *Cell Rep* 36: 109529

Wynne DJ, Rog O, Carlton PM, Dernburg AF (2012) Dynein-dependent processive chromosome motions promote homologous pairing in *C. elegans* meiosis. *J Cell Biol* 196: 47-64

Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, Tong L (2000) Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 408: 111-115

Yin X, Gower NJ, Baylis HA, Strange K (2004) Inositol 1,4,5-trisphosphate signaling regulates rhythmic contractile activity of myoepithelial sheath cells in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 15: 3938-3949

Yin Y, Smolikove S (2013) Impaired resection of meiotic double-strand breaks channels repair to nonhomologous end joining in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* 33: 2732-2747

Zanetti S, Puoti A (2013) Sex determination in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Adv Exp Med Biol* 757: 41-69

Zarkower D (2006) Somatic sex determination. *WormBook*: 1-12

Zhan M, Jin B, Chen SE, Reecy JM, Li YP (2007) TACE release of TNF-alpha mediates mechanotransduction-induced activation of p38 MAPK and myogenesis. *J Cell Sci* 120: 692-701

Zhang B, Gallegos M, Puoti A, Durkin E, Fields S, Kimble J, Wickens MP (1997) A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line. *Nature* 390: 477-484

Zhang J, Grindley JC, Yin T, Jayasinghe S, He XC, Ross JT, Haug JS, Rupp D, Porter-Westpfahl KS, Wiedemann LM *et al* (2006) PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature* 441: 518-522

Zhang L, Ward JD, Cheng Z, Dernburg AF (2015) The auxin-inducible degradation (AID) system enables versatile conditional protein depletion in *C. elegans*. *Development* 142: 4374-4384

Zhou T, Kurnasov O, Tomchick DR, Binns DD, Grishin NV, Marquez VE, Osterman AL, Zhang H (2002) Structure of human nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase. Basis for the dual substrate specificity and activation of the oncolytic agent tiazofurin. *J Biol Chem* 277: 13148-13154

Zhu R, Chin-Sang ID (2024) *C. elegans* insulin-like peptides. *Mol Cell Endocrinol* 585: 112173

ANNEXE

Regulation of stem cell proliferation by p38 MAPK signaling

Authors

Alexandre Clouet and Patrick Narbonne*

Publié (Med Discoveries)

Affiliations

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

Mailing address:

Patrick Narbonne

Département de Biologie Médicale

Université du Québec à Trois-Rivières

3351 Boul. Des Forges,

Trois-Rivières, QC, Canada

G8Z 4M3

Tel: +1 819-376-5011 (ext. 3309)

Abstract

The p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) is a key member of a highly conserved superfamily of protein kinases. Mostly sensitive to inflammatory cytokines and stress signals, p38 activation leads to a variety of cellular responses, including proinflammatory cytokines secretion, cell survival, apoptosis induction and the regulation of cell proliferation. Here, we carried a focused investigation on the the recent literature, across all systems and organisms, concerning role of p38 towards the regulation of stem cell (SC) proliferation. Interestingly, we found that p38 can exert either a pro- or an anti-proliferative function, depending on the specific models and contexts. It is also activated by a variety of upstream signals and regulates SC proliferation through a wide diversity of molecular effectors. Whereas p38 regulated SC proliferation mostly cell-autonomously, an example of a non-cell autonomous p38-dependent regulation of SC proliferation was recently uncovered. Altogether, bringing together these recent findings improve our comprehension of the effects p38 has on SC proliferation, while these mechanisms and effectors appear as being conserved through evolution.

Introduction

Mitogen activated protein kinases (MAPKs) are a highly conserved superfamily of Ser/Thr kinases involved in signal transduction. The MAPK signaling cascade requires consecutive phosphorylation of three protein kinases: MAPK kinase kinase (MAP3K) phosphorylates MAPK kinase (MAP2K), which in turn phosphorylates MAPK. Following extra and/or intracellular signals, the activation of MAPKs induce a wide range of cellular responses by phosphorylating many downstream effectors. The p38 MAPK (p38) is one of the main MAPKs families. The canonical p38 pathway mainly responds to inflammatory cytokines and stress signals, leading to the activating phosphorylation of one of several MAP3Ks (MEKK1-3, MLK2/3, ASK, Tpl2, TAK1 and/or TAO1/2), in turn activating a MAP2K (MAP2K3/6), to finally turn ON the p38 MAPK. Following this activation, p38 phosphorylates a number of downstream effectors, including cPLA2, MNK1/2, MK2/3, HuR, GADD153, Ets1, p53 and MSK1/2 in the cytoplasm, and ATF1/2/6, MEF2, Elk-1, GADD153, Ets1, p53 and MSK1/2 in the nucleus. The activation of p38 most often results in the production of proinflammatory cytokines, the promotion of cell survival or apoptosis, and the regulation of cell proliferation (Cargnello & Roux, 2011).

In this minireview, we aimed to cover the effects of p38 signaling on stem cell (SC) proliferation, across all systems and organisms. We conducted a PubMed search using the terms “p38 stem cell proliferation” and focused on articles published since 2020. Among these, we selected the articles that we considered as being the most relevant and informative regarding this important question.

Pro-proliferative effects of p38 signaling

Several pieces report a pro-proliferative role for p38 in various types of SCs. We first present *in vitro* evidence, largely relying on SC proliferation assays in culture, followed by *in vivo* analyses that quantified SC proliferation within complete organisms.

***In vitro* analyses**

Several recent *in vitro* analyses have placed p38 as an important positive regulator of SC proliferation. In cultured murine vascular SCs for example, the addition of ATP activates purinergic metabotropic P2Y receptors and promotes p38 activation. This was accompanied by an increase in the number of viable cells compared to an unstimulated control. Interestingly, the addition of the p38 inhibitor SB203580 decreased both phosphorylated p38 (p-p38) levels and viable cell numbers, suggesting that p38 promotes vascular SC proliferation in response to ATP (Cui *et al*, 2023).

Another example of the pro-proliferative functions of p38 *in vitro* comes from an analysis of chicken muscle SCs. In chicken muscle SCs, gga-miR-3525 microRNA has an anti-proliferative function: its overexpression inhibited SC proliferation, whereas its depletion promoted SC proliferation. Indeed, the inhibition of miR-3525 decreased the proportion of cells in G0/G1 phase, and increased the proportion of cells in S phase, suggesting an increased proliferation of muscle SCs. PDLIM3, an inhibitory target of miR-3525, had the opposite effect, and promoted SC proliferation. Notably, PDLIM3 overexpression in chicken muscle SCs increased p38 activation. This activation was abrogated either by mir-3525 overexpression, or by exposure to the p38 inhibitor SB203580, suggesting PDLIM3 positively regulates p38, and mir-3525 inhibits p38 by targeting PDLIM3 (Yin *et al*, 2020). Furthermore, in murine cultured myoblasts, MicroRNA-668-3p treatment directly downregulates its target, Appl1, a positive regulator of myoblast proliferation and differentiation. Noticeably, miR-668-3p inhibition and Appl1 overexpression are accompanied by an increase in p-p38 levels in the same cell type, suggesting these actors play in the same cascade

to promote myoblast, and potentially also muscle SC proliferation (Cao *et al*, 2023). These two studies emphasized disruption of p38 pro-proliferative functions by microRNA-dependent inhibition of its upstream effectors.

The p38 MAPK also regulates SC proliferation downstream extracellular stress signals. Pulsating fluid shear stress is a model where culture medium is pumped through a flow chamber containing SCs, submitting them to a cyclic changing pressure gradient. In cultured murine primary muscle SCs, also known as satellite cells, pulsating fluid shear stress promotes p38 phosphorylation and is associated with the upregulation of c-Fos, Cdk4 and IL-6 proliferation marker mRNA levels (Haroon *et al*, 2021). As previous studies had demonstrated that p-p38 was required for muscle SC proliferation (Jones *et al*, 2005), these results raised the hypothesis that pulsating fluid shear stress could promote muscle SC proliferation through p38 activation.

The p38 MAPK promotes proliferation in other mammalian SC culture models. The treatment of rabbit corneal epithelial SCs, also known as limbal SCs, with pro-proliferative glycoprotein SPARC quickly induced p38 phosphorylation. Enhanced SPARC-mediated proliferation was abolished following a co-treatment with the p38 inhibitor SB203580, or the JNK MAPK inhibitor SP600125, indicating that p38 and JNK MAPK pathways are positive regulators of SPARC-mediated limbal SC proliferation (Zhu *et al*, 2020).

The positive regulation of SC proliferation by p38 is conserved across several cultured human SC types. PBK/TOPK is a MAP2K-like protein that is activated during M-phase in HeLa cancer SCs by cyclinB/cyclin dependent kinase 1 (CDK1) phosphorylation (Gaudet *et al*, 2000). While PBK/TOPK has been shown to phosphorylate P38 *in vitro*, but not ERK or JNK MAPK, elevated p-p38 levels were detected in cyclinB+ primary cerebral granule cell precursor, suggesting that p38 is activated during mitosis in these progenitors too. Furthermore, the p-PBK/TOPK and p-p38 signal overlapped in primary cerebral granule cell precursor lines. Treating these cerebral

granule cell precursors with the p38 inhibitor SB203580 partially decreased BrdU+ S-phase cells, again supporting the pro-proliferative function of this pathway in neural progenitors (Dougherty *et al*, 2005).

Treating human cardiac SCs with blood serum and blood plasma increased cell counts, suggesting increased proliferation rates. Treatment with either of two p38 inhibitors, BMS-582949 or SB20239063, partially disrupted the pro-proliferative and pro-survival effect of blood serum exposure (Hoving *et al*, 2020).

Still in humans, the co-inhibition of p38 and mTORC1 with inhibitors LY2228820 and rapamycin, respectively, downregulated cultured umbilical cord blood SC proliferation, and increased G0/G1 phase cell counts (Li *et al*, 2020).

More recently, in human neural SCs, as well as in derived cerebral organoid cells, it was found that the SKF83556 ligand activates the dopamine D1 receptor and its two intracellular effectors β -arrestin 2 and Epac2. β -arrestin 2 in turn activates p38, which cooperates with Epac2 to promote proliferation (Dong *et al*, 2022).

Finally, the sympathetic nervous system activates the ADRA1B adrenergic receptor at the surface of dental pulp SCs and triggers their metabolic reprogramming from oxidative phosphorylation to anaerobic glycolysis metabolism, all while inhibiting SC proliferation. Interestingly, the levels of p-P38 were found to be reduced following ADRA1B overexpression and increased following ADRA1B loss-of-function. Moreover, dental pulp SC treatment with a p38 agonist, dehydrocorydaline chloride, was sufficient to rescue metabolic reprogramming and the weakened proliferative capacity that result from ADRA1B overexpression. Altogether, those results suggest that ADRA1B inhibits p38 to reduce dental pulp SC proliferation (Yang *et al*, 2023).

In vivo analyses

In vivo examples of positive regulation of SC proliferation by p38 were found in an invertebrate organism. The parasitic flatworm *Schistosoma mansoni* adults release mediators promoting their survival while they infect a human host, as they are surrounded by the host's immune cells and effectors (Liu *et al*, 2009). These excretory-secretory products that are released by both male and female individuals activate p38 signaling in the tegument, musculature, and reproductive organs of opposite sex individuals, and promote germline development. As a matter of fact, single-sex cultures displayed decreased germline SC proliferation while exposure to excretory-secretory products restored high germline SC proliferation rates. Treatment with the p38 SB203580 inhibitor completely abolished the increased proliferation, indicating that this mechanism depends on p38 activation. These results are consistent with the robust p38 expression in *S. mansoni* germline SCs and their cellular progeny that was reported more recently (Shakir *et al*, 2023).

The p38-dependent stimulation of SC proliferation downstream of stress signals is conserved in mammals. Under hematologically stressful conditions, such as during irradiation, the body becomes depleted of its blood cells. If a lethal dose is not reached, bone marrow hematopoietic SCs enter the cell cycle, and repopulate the entire hematopoietic system (Blanpain *et al*, 2011). Similarly, following 5-fluorouracil treatment, differentiated hematopoietic cells are systemically eliminated and proliferation of quiescent hematopoietic SCs is induced. In such conditions, the mortality of p38(-/-) mice was significantly higher than that of control mice, suggesting that p38 function is required to promote hematopoiesis, required to ensure survival. Accordingly, p-p38 expression was significantly increased in hematopoietic SCs following 5-fluorouracil treatment. p38(-/-) hematopoietic SCs transplanted in lethally irradiated animals displayed lower proliferation rates compared to animals transplanted with wild-type cells. In the same study, authors also studied the mechanisms by which transplanted p38(+/+) hematopoietic

SCs replace damaged endogenous hematopoietic SCs in lethally irradiated mice. They found that in these cells, after transplantation, p-p38 activates the *Mitf* transcription factor, leading to increased *Impdh2* expression. The IMPDH2 protein in turn was found to positively regulate purine metabolism, promoting cell cycle progression (Karigane *et al*, 2016).

Murine spermatogonial SC treatment with FGF9 increases p38 phosphorylation and may also promote proliferation, since it leads to increased cell numbers relative to untreated cultures. The inhibition of p38 with SB203580 reversed the phenotype induced by FGF9, suggesting that p38 mediates the pro-proliferative effects of FGF9 in this system (Yang *et al*, 2021). Interestingly, authors found that *Fgf9* overexpression inhibits spermatogenesis in mice and leads to undifferentiated spermatogonia accumulation. Therefore, FGF9 may not only promote spermatogonial SC proliferation, but also inhibit their differentiation.

Still in mice, a *Casp9* floxed allele was generated and crossed into a line driving inducible Cre recombinase expression in the hair follicle SC compartment (bulge and hair germ). These transgenic mice also displayed a *Rosa26-EYFP* cassette, allowing the tracking of Cre recombination events. During the telogen phase of hair growth, *Casp9* depletion in hair follicle delayed apoptosis and the clearance of hair follicle SCs. *Casp9* depletion also significantly increased both EYFP⁺ and EYFP⁻ hair follicle SC proliferation in bulge and hair germ compartments. The majority of proliferating Ki67⁺ cells were however adjacent to cleaved-Casp3⁺ apoptotic cells, the latter also expressing the *Wnt3* pro-proliferative ligand. This *Wnt3* mRNA induction in apoptotic cells was abolished by a treatment with the p38 inhibitor SB203580. Interestingly, the *Dusp8* dual-specificity phosphatase, a physiological inhibitor of p38, can be cleaved by *Casp3 in vitro*. Moreover, *Dusp8* protein levels were reduced in cleaved-Casp3⁺ hair follicle SCs. This low level of *Dusp8* correlated with high *Wnt3* expression and p38 phosphorylation. Mechanistically, it was therefore proposed that *Casp3* may cleave the *Dusp8*

phosphatase in apoptotic cells to alleviate the inhibition of p38, thus promoting Wnt3 induction and the stimulation of adjacent hair follicle SC proliferation. This study shows for the first time, a non-cell autonomous pro-proliferative function of p38, through Wnt3 ligand induction (Ankawa *et al*, 2021; Haroon *et al.*, 2021).

Anti-proliferative functions of p38 signaling

Again, we will first cover the *in vitro* situations where p38 had anti-proliferative effects, followed by *in vivo* evidence.

***In vitro* analyses**

In organoids derived from murine intestinal crypt cells, hexokinase 2 depletion, or 2-desoxyglucose treatment, inhibits glycolysis. As a result, organoids growth was significantly decreased compared to untreated controls, and this phenotype was rescued by adding the SB202190 p38 inhibitor. Moreover, in hexokinase 2-depleted and 2-desoxyglucose-treated organoids, p38 inhibition led to the downregulation of differentiation marker expression, such as LYZ, MUC2 and ATOH1. These results suggest that under metabolic stress condition, p38 inhibits intestinal crypt SC proliferation, instead promoting their differentiation (Li *et al*, 2023).

Negative regulation of SC proliferation by p38 also occurred in rodent cultures. During cardiac muscle differentiation in culture, their proliferation stalls. Exposure to the p38 inhibitor SB203580 however abolished this cell cycle arrest by removing Raf/ERK inhibition and led to increased proliferation in a pro-differentiation culture medium. Hence, it was proposed that p38 promotes cell cycle arrest by inhibiting the Raf/ERK pathway (Lee *et al*, 2002). This result is further supported by a recent study of human embryonic SCs. In these, p38 inhibition by SB203580

led to increased cell counts compared to control, likely due to increased proliferation (Taei *et al*, 2020).

The sometimes anti-proliferative role of p38 was confirmed in another model of cultured mammalian muscle SCs. Short term p38 inhibition by SB203580 decreased proliferation in cultured bovine muscle SCs. The p38 inhibitor also caused an increase in muscle SC marker PAX7 mRNA expression and decreased muscular cell differentiation markers pHSP27 and MyHC at the protein level. However, at lower inhibitor concentrations and in the presence of FGF-2, p38 inhibition slightly increased cell numbers compared to non-treated cells. These results suggest that p38 signaling could have both pro- and anti-proliferative functions in the same cell type and species depending on the context, on top of influencing cell identity (Ding *et al*, 2018).

***In vivo* analyses**

In vivo evidence showing p38-dependent inhibition of SC proliferation were hardly found across the reviewed literature: this is clearly an area where further investigation will be required.

Yet, in the mouse intestine, aging was associated with increased MKK6 MAPKK expression, increased p38 activation, and increased mTORC1 activity. Rapamycin treatment suppressed both MKK6 and p38 activation, suggesting that mTORC1 acts upstream of the MKK6 to p38 axis. In addition, p38 inhibition with SB203580 increased Ki67⁺ intestine transit amplifying cells, supporting an anti-proliferative effect of p38 in this *in vivo* system (He *et al*, 2020). Whether intestinal SCs are similarly affected by p38 was however not investigated.

Conclusion

The effects of p38 on SC proliferation were investigated in recent studies across a wide variety of models and organisms. These are summarized in Figure 1. It appears that the particular effect, whether it be promoting or inhibiting SC proliferation, is highly dependent on the model and context. In most cases, the effects were cell-autonomous, but there was also an example where p38 promoted SC proliferation non-autonomously, from adjacent cells. Upstream regulators and downstream effectors also differed depending on the cell types and contexts. In many cases, it was unclear whether p38 regulation required canonical upstream regulators (MAP3K and MAP2K) and whether it was acting through the same downstream targets. It also appears that p38 can even have opposite roles in the same cell types, depending on species and contexts (e.g., muscle SCs; (Cao *et al.*, 2023; Ding *et al.*, 2018; Haroon *et al.*, 2021; Yin *et al.*, 2020), and even within the same cells, depending on its activation level (Ding *et al.*, 2018). Addressing the full molecular cascades leading to p38-mediated inhibition of SC proliferation within their *in vivo* complexity is certainly one of the next challenges in the field.

Acknowledgements

Research in the Narbonne Laboratory is funded by grants from the NSERC (RGPIN-2019-06863, RGPAS-2019-00017, DGEER-2019-00326) and the CIHR (PJT-169138) to PN. PN is an FRQ-S Junior 2 Bursary Scholar (310643).

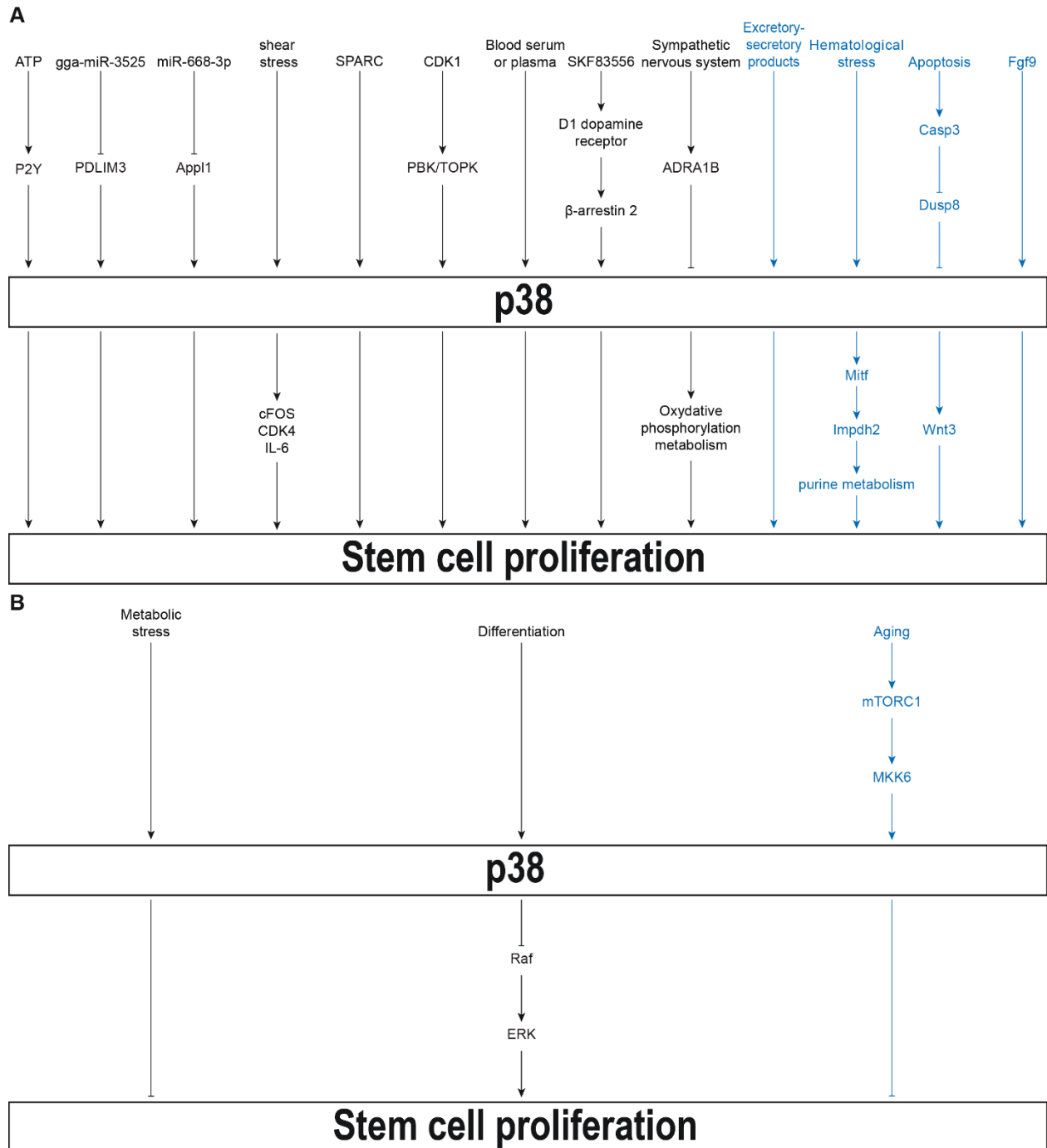


Figure A-1. Effectors of p38 MAPK-mediated regulation of SC proliferation.

A) Pro-proliferative effects, B) Anti-proliferative effects. Black: supported by *in vitro* data, Blue: supported by *in vivo* data.

References

- Ankawa R, Goldberger N, Yosefzon Y, Koren E, Yusupova M, Rosner D, Feldman A, Baror-Sebban S, Buganim Y, Simon DJ *et al* (2021) Apoptotic cells represent a dynamic stem cell niche governing proliferation and tissue regeneration. *Dev Cell* 56: 1900-1916 e1905
- Blanpain C, Mohrin M, Sotiropoulou PA, Passegue E (2011) DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 8: 16-29
- Cao H, Du T, Li C, Wu L, Liu J, Guo Y, Li X, Yang G, Jin J, Shi X (2023) MicroRNA-668-3p inhibits myoblast proliferation and differentiation by targeting Appl1. *BMC Genomics* 24: 415
- Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 50-83
- Cui Y, Li C, Zeng X, Wei X, Li P, Cheng J, Xu Q, Yang Y (2023) ATP purinergic receptor signalling promotes Sca-1(+) cell proliferation and migration for vascular remodelling. *Cell Commun Signal* 21: 173
- Ding S, Swennen GNM, Messmer T, Gagliardi M, Molin DGM, Li C, Zhou G, Post MJ (2018) Maintaining bovine satellite cells stemness through p38 pathway. *Sci Rep* 8: 10808
- Dong X, Chen Y, Lu J, Huang S, Pei G (2022) beta-Arrestin 2 and Epac2 Cooperatively Mediate DRD1-Stimulated Proliferation of Human Neural Stem Cells and Growth of Human Cerebral Organoids. *Stem Cells* 40: 857-869
- Dougherty JD, Garcia AD, Nakano I, Livingstone M, Norris B, Polakiewicz R, Wexler EM, Sofroniew MV, Kornblum HI, Geschwind DH (2005) PBK/TOPK, a proliferating neural progenitor-specific mitogen-activated protein kinase kinase. *J Neurosci* 25: 10773-10785
- Gaudet S, Branton D, Lue RA (2000) Characterization of PDZ-binding kinase, a mitotic kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5167-5172
- Haroon M, Klein-Nulend J, Bakker AD, Jin J, Seddiqi H, Offringa C, de Wit GMJ, Le Grand F, Giordani L, Liu KJ *et al* (2021) Myofiber stretch induces tensile and shear deformation of muscle stem cells in their native niche. *Biophys J* 120: 2665-2678
- He D, Wu H, Xiang J, Ruan X, Peng P, Ruan Y, Chen YG, Wang Y, Yu Q, Zhang H *et al* (2020) Gut stem cell aging is driven by mTORC1 via a p38 MAPK-p53 pathway. *Nat Commun* 11: 37
- Hoving AL, Schmidt KE, Merten M, Hamidi J, Rott AK, Faust I, Greiner JFW, Gummert J, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C *et al* (2020) Blood Serum Stimulates p38-Mediated Proliferation and Changes in Global Gene Expression of Adult Human Cardiac Stem Cells. *Cells* 9
- Jones NC, Tyner KJ, Nibarger L, Stanley HM, Cornelison DD, Fedorov YV, Olwin BB (2005) The p38alpha/beta MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *J Cell Biol* 169: 105-116
- Karigane D, Kobayashi H, Morikawa T, Ootomo Y, Sakai M, Nagamatsu G, Kubota Y, Goda N, Matsumoto M, Nishimura EK *et al* (2016) p38alpha Activates Purine Metabolism to Initiate Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Cycling in Response to Stress. *Cell Stem Cell* 19: 192-204
- Lee J, Hong F, Kwon S, Kim SS, Kim DO, Kang HS, Lee SJ, Ha J, Kim SS (2002) Activation of p38 MAPK induces cell cycle arrest via inhibition of Raf/ERK pathway during muscle differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 298: 765-771
- Li C, Zhou Y, Wei R, Napier DL, Sengoku T, Alstott MC, Liu J, Wang C, Zaytseva YY, Weiss HL *et al* (2023) Glycolytic Regulation of Intestinal Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 15: 931-947
- Li X, Ma X, Chen Y, Peng D, Wang H, Chen S, Xiao Y, Li L, Zhou H, Cheng F *et al* (2020) Coinhibition of activated p38 MAPKalpha and mTORC1 potentiates stemness maintenance of

HSCs from SR1-expanded human cord blood CD34(+) cells via inhibition of senescence. *Stem Cells Transl Med* 9: 1604-1616

Liu F, Cui SJ, Hu W, Feng Z, Wang ZQ, Han ZG (2009) Excretory/secretory proteome of the adult developmental stage of human blood fluke, *Schistosoma japonicum*. *Mol Cell Proteomics* 8: 1236-1251

Shakir EMN, Rinaldi G, Kirk RS, Walker AJ (2023) *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products induce protein kinase signalling, hyperkinesia, and stem cell proliferation in the opposite sex. *Commun Biol* 6: 985

Taei A, Samadian A, Ghezel-Ayagh Z, Mollamohammadi S, Moradi S, Kiani T, Janzamin E, Farzaneh Z, Tahamtani Y, Braun T *et al* (2020) Suppression of p38-MAPK endows endoderm propensity to human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 527: 811-817

Yang C, Gao Q, Xu N, Yang K, Bian Z (2023) Human Dental Pulp Stem Cells Are Subjected to Metabolic Reprogramming and Repressed Proliferation and Migration by the Sympathetic Nervous System via α 1B-Adrenergic Receptor. *J Endod* 49: 1641-1651 e1646

Yang F, Whelan EC, Guan X, Deng B, Wang S, Sun J, Avarbock MR, Wu X, Brinster RL (2021) FGF9 promotes mouse spermatogonial stem cell proliferation mediated by p38 MAPK signalling. *Cell Prolif* 54: e12933

Yin H, Zhao J, He H, Chen Y, Wang Y, Li D, Zhu Q (2020) Gga-miR-3525 Targets PDLIM3 through the MAPK Signaling Pathway to Regulate the Proliferation and Differentiation of Skeletal Muscle Satellite Cells. *Int J Mol Sci* 21

Zhu J, Wang LY, Li CY, Wu JY, Zhang YT, Pang KP, Wei Y, Du LQ, Liu M, Wu XY (2020) SPARC promotes self-renewal of limbal epithelial stem cells and ocular surface restoration through JNK and p38-MAPK signaling pathways. *Stem Cells* 38: 134-145

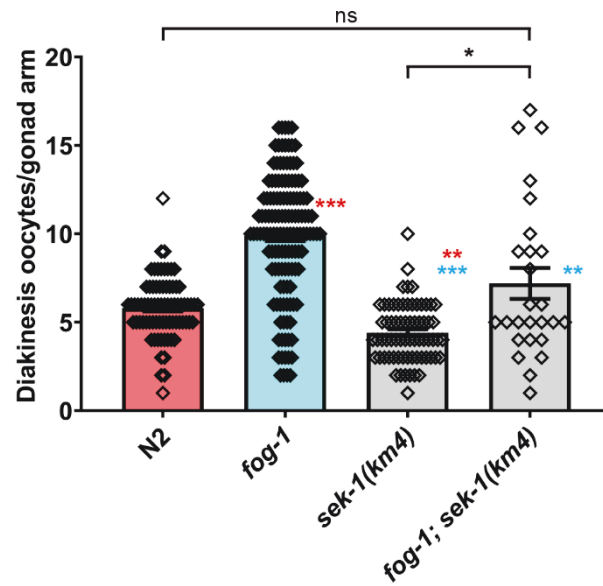


Figure A-2. Une délétion de 2,1 kb de *sek-1* n'aboutit pas à l'accumulation significative d'ovocytes au stade diakinèse dans les vers féminisés. Nombre moyen d'ovocytes au stade diakinèse par gonades (taille d'échantillon : 76-134-68-26). Les astérisques rouges indiquent une différence significative par rapport aux WT, bleues par rapport aux *fog-1*. Un astérisque, $p < 0.05$; deux astérisques, $p < 0.01$; trois astérisques, $p < 0.001$. Ns, non-significatif (test de Kruskal-Wallis, suivi du test post-hoc de Dunn). La méthodologie est similaire à celle du chapitre II. Allèles : *fog-1(q253)*, *sek-1(km4)*.

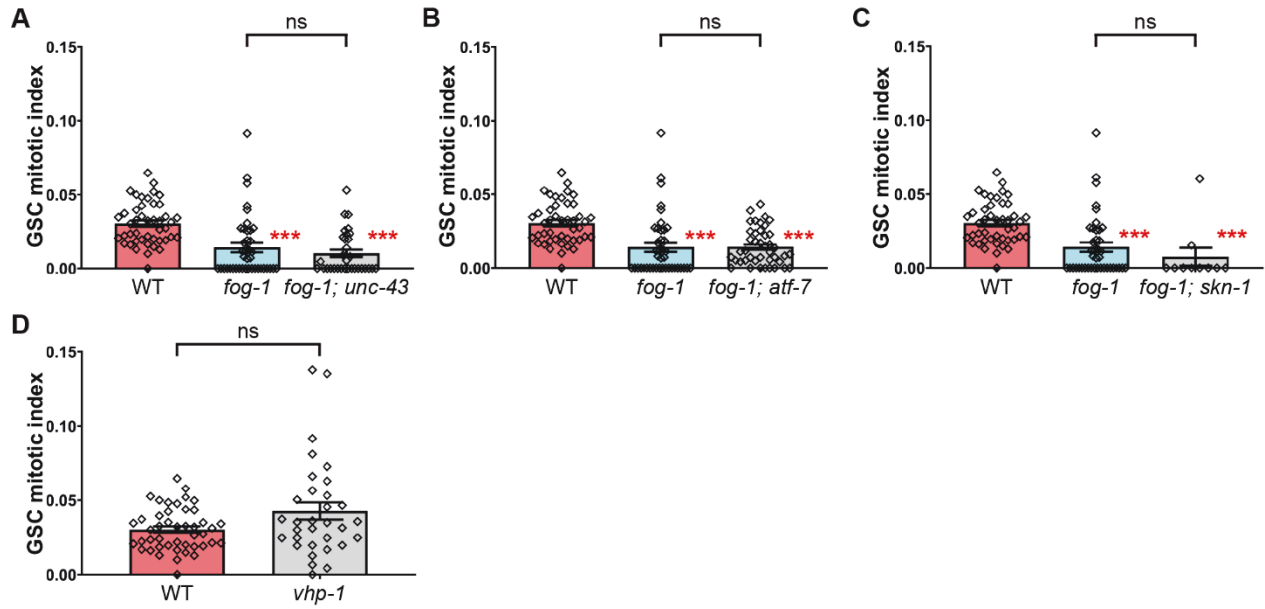


Figure A-3. UNC-43, ATF-7, SKN-1 et VHP-1 ne semblent pas requises dans la signalisation homéostatique germinale. (A-C) Indice mitotique moyen des CSG pour les génotypes indiqués (taille d'échantillon : (A) 45-41-32 (B) 45-41-42 (C) 45-41-10 (D) 45-32). Chaque barre représente la moyenne $\pm$ SEM et chaque point représente une gonade différente. Trois astérisques rouges indiquent une différence significative ($p < 0.001$) par rapport aux WT. Ns, non-significatif (A-C, test de Kruskal-Wallis, suivi du test post-hoc de Dunn ; D, test de Mann-Whitney). La méthodologie est similaire à celle du chapitre II. Allèles : *fog-1(q253)*, *unc-43(e408)*, *attf-7(gk715)*, *skn-1(mg570)*, *vhp-1(sa366)*.

Tableau A-1: Criblage ARNi, dans le fond génétique *oma-1, 2*, des protéines kinases activées en réponse aux stress

RNAi-targeted gene	Human homolog(s)	Differentiated germ cells hyperaccumulation*
<i>dlk-1</i>	MAP3K12/13	-
<i>mkk-4</i>	MAP2K4	-
<i>sek-3</i>	MAP2K4	-
<i>sek-4</i>	MAP2K6	-
<i>sek-5</i>	MAP2K6	-
<i>sek-6</i>	MAP2K4	-

*When targeted by RNAi in the *oma-1*; *oma-2* genetic background.

Tableau A-2: Criblage ARNi, dans le fond génétique *oma-1, 2*, des gènes requis dans l'intégration de stress mécaniques ou oxydatifs

RNAi-targeted gene	Human homolog(s)	Differentiated germ cells hyperaccumulation*
<i>act-3 (act1/2/4)</i>	ACTG2	-
<i>act-4 (act1/2/3)</i>	ACTB, ACTG1/2, POTEKP	-
<i>act-5</i>	POTEE	-
<i>cdh-1</i>	DCHS1/2	-
<i>cdh-3</i>	FAT4	-
<i>cdh-4</i>	FAT1/2/3	-
<i>cdh-5</i>	PCDH15	-
<i>cdh-9</i>	PCDH7/9/20	-
<i>epi-1</i>	LAMA3/5	-
<i>fmi-1</i>	CELSR1/2/3	-
<i>hmp-2</i>	JUP/CTNNB1	-
<i>hmr-1</i>	CDH1	-
<i>ina-1</i>	ITGA3/6/7	-
<i>ire-1</i>	ERN2	-
<i>lmn-1</i>	LMNA, LMB1/2	-
<i>mec-1</i>		-
<i>mec-2</i>	STOM	-
<i>mec-3</i>	LHX1/5	-
<i>mec-5</i>	COL4A1	-
<i>mec-6</i>	PON1	-
<i>mec-8</i>	RBPMS	-
<i>mec-9</i>	NOTCH2	-
<i>mec-10</i>	SCNN1	-
<i>mec-12</i>	TUBA1/3/4	-
<i>mec-14</i>	KCAB1	-
<i>mec-15</i>	FBXW9	-
<i>mec-16</i>	BSX	-
<i>mec-18</i>		-
<i>mec-19</i>		-
<i>ocr-2</i>	TRPV3/5/6	-
<i>osm-9</i>	TRPV1/3/4/5/6	-

<i>pat-2</i>	ITGA2B5/8, ITGAV	-
<i>pezo-1</i>	PIEZO1/2	-
<i>sod-2</i>	SOD2	-
<i>sod-4</i>	SOD1	-
<i>sod-5 (sod-4)</i>	SOD1	-
<i>tmc-1</i>	TMC1/2/3	-
<i>tmc-2</i>	TMC3	-
<i>unc-8</i>	SCNN1A/B/D/G	-

*When targeted by RNAi in the *oma-1*; *oma-2* genetic background.