

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

RÉGULATION DE LA PROLIFÉRATION DES CELLULES SOUCHES
CHEZ *C. ELEGANS*

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

PAR
BENJAMIN DUFOUR

AOÛT 2021

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.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tous ceux qui m'ont permis et aidé à d'accomplir ce projet de recherche. D'abord la Dre. Céline Van Themsche sans qui je n'aurais jamais rencontré le Dr. Patrick Narbonne. Mon directeur de recherche, le Dr. Patrick Narbonne m'ayant donné la chance de faire une maîtrise dans son laboratoire et même plus si je l'avais souhaité. Le Dr. Éric Asselin et les membres de son laboratoire qui nous ont prêté des paillasse et une salle pour notre microscope à fluorescence Leica pour pouvoir commencer à travailler avant que Patrick ait son propre laboratoire. Le Dr. Lionel Berthoux pour son microscope à fluorescence Zeiss un peu vieux et son autoclave. La technicienne de laboratoire Mélodie B. Plourde pour tous ses judicieux conseils et plusieurs de ses protocoles. Les Dres. Iva Greenwald et Claire de la Cova qui nous ont fourni les souches initiales senseur (GS8729) et contrôle (GS8752) pour les expériences du nKTR.

Tous les membres du laboratoire que j'ai eu la chance (sauf Évelyne) de côtoyer et qui m'ont enduré. Le fendant Vincent Roy, « gels en eau » Andres Felipe Romero Rodriguez, « Serial Cloner » Olivier Gagné, (pas de surnom) Catherine Sanche, monitrice du camp Papillon May-Linda Lamy, l'évangéliste Ange Danielle Amani Brou, « Ok, ça part! » William White, « Valer Sartan » et « Masterdruid » Pier-Olivier Martel, l'indien Rudra Shekar Bose, « le grand-père à Pat » Xavier Lechasseur et le séquenceur de mes allèles *nar4* et *nar5*, Matthieu « Dieu » Valet. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec ces gens et à bouger un peu sur l'heure du midi durant l'été avec eux. Sans oublier, nos BBQ chez Pat et la fameuse sortie de pêche. Un merci spécial à Oli qui a été mon collègue le moins « chokeux » de la gang.

Pour terminer, je remercie les organismes subventionnaires suivant : NSERC, FRQNT, FCI, en plus de la Fondation UQTR, du Département de Biologie Médicale et du GRSC.

RÉSUMÉ

Les cellules souches offrent un énorme potentiel thérapeutique et nous avons voulu approfondir nos connaissances sur la régulation de leur prolifération. Sur ce thème, j'ai participé dans deux projets utilisant la lignée germinale de *C. elegans* comme système modèle.

Le premier concerne un mécanisme rétroactif qui inhibe la prolifération des cellules souches quand leur prolifération n'est pas requise par le tissu qu'elles servent. Nous voulions connaître plus de protéines impliquées dans ce mécanisme. Nous avons procédé par mutagenèse aléatoire. Cinq mutants ont été identifiés et ont été séquencés. Les résultats préliminaires suggèrent que deux des mutants séquencés ont eu une mutation sévère dans le gène *aak-1*.

Le deuxième projet était d'analyser l'activité de MPK-1/MAPK dans les cellules souches de la lignée germinale de *C. elegans*. Nous savions que MPK-1 favorisait la prolifération des cellules souches germinales (CSG), mais nous ne savions pas si son activité était requise dans les cellules souches elles-mêmes ou depuis d'autre(s) tissu(s) de l'animal. Pour ce faire, nous avons utilisé la technologie du nKTR et avons détecté une faible mais significative activité MPK-1/MAPK dans les CSG. Toutefois, cette activité ne corrélait pas avec les niveaux de prolifération des CSG. Il est donc improbable que l'activité MPK-1 présente dans les CSG soit reliée à leur rythme de prolifération. Confirmant mes résultats, les résultats de mes collègues indiquent que MPK-1/MAPK est requis de manière non-autonome pour la prolifération des cellules souches de *C. elegans*, depuis la gonade somatique ou l'intestin de l'animal.

Mes travaux ont ainsi permis d'avancer notre compréhension de la régulation de la prolifération des cellules souches germinales chez *C. elegans*, mais permettent aussi d'émettre des hypothèses éclairées en lien avec ce type de régulation chez l'être humain.

Mots-clés : Cellules souches, *C. elegans*, régulation, MPK-1/ERK, lignée germinale.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	ix
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
Historique de <i>C. elegans</i>	1
Prix Nobel de 2002.....	1
Prix Nobel de 2006.....	2
Prix Nobel de 2008.....	3
But du laboratoire Narbonne.....	4
Cellules souches	4
Avantages de <i>C. elegans</i>	6
Hermaphroditisme	6
Transparence	7
Croissance rapide	7
Formation de la lignée germinale.....	9
Homologie avec le génome humain	15
Maintenance de <i>C. elegans</i>	16
CHAPITRE II	
PROJET 1 : LE MÉCANISME RÉTROACTIF DE LA PROLIFÉRATION DES CS.....	18
Origine du projet	18
Indice mitotique.....	20
Balanceur génétique « Unc »	21
Lignée germinale fluorescente	22
Gènes connus du mécanisme rétroactif.....	22
Hypothèse.....	22
Élucider le mécanisme rétroactif.....	22

L'EMS	23
Mécanisme général.....	23
Déroulement des mutagenèses	24
Caractérisation des mutants et paramètres d'acquisition	24
Test de complémentation	25
Séquençage des mutants.....	26
Hybridation des mutants.....	26
Résultats	30
Caractérisation des lignées germinales des mutants	30
Identification des gènes mutés	32
Tests de complémentation.....	32
Discussion	33
Résultats préliminaires des séquençages.....	34
CHAPITRE III	
PROJET 2 : ACTIVITÉ DE MPK-1/MAPK DANS LES CSG.....	36
Origine du projet	36
Technologie du KTR.....	37
Spécifications des mesures avec le nKTR	39
Méthode générale	39
Régions du pachytène et de la niche	41
Région des ovocytes.....	41
Cellules analysées	41
Région des ovocytes.....	41
Région du pachytène	41
Région de la niche.....	42
Génotypes analysés	42
Génotype <i>lin-3/EGF</i>	43
Génotype <i>fog-1</i>	45
Génotype <i>let-60gf/RASgf</i>	46
Génotype <i>mpk-1B</i>	47
Précisions concernant les croisements des souches	49

Acquisitions d'images des <i>C. elegans</i>	49
Préparation des nématodes	49
Synchronisation de <i>C. elegans</i>	50
Paramètres d'acquisition	50
Inconvénients de la méthode d'analyse avec le nKTR	51
Traitement des données, statistiques et graphiques.....	52
Résultats	52
Région des ovocytes.....	52
Région du pachytène	53
Région de la niche.....	53
Discussion	54
CHAPITRE IV	
PUBLICATION	57
Résumé des analyses dans l'article en annexe	57
Résultats de l'article en annexe.....	57
Résumé de l'article en annexe.....	64
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	67
ANNEXE A	
NON-AUTONOMOUS REGULATION OF GERMLINE STEM CELL PROLIFERATION BY SOMATIC MPK-1/MAPK ACTIVITY IN <i>C. ELEGANS</i>.....	74

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1 Stades de développement des cellules souches chez le mammifère.....	5
2 Stades de croissance et cycle de vie de <i>C. elegans</i>	9
3 Migration des cellules Z1 et Z4.....	10
4 Visuel d'une niche de <i>C. elegans</i>	11
5 Voie de signalisation de la différenciation des CSG.....	12
6 Voie MAPK de croissance et différenciation chez l'humain.....	14
7 Adaptée de Figure 2; AAK-1 couples GSC prolifération to oocyte accumulation.....	19
8 Exemple d'une gonade extrudée et colorée par immunofluorescence afin de mesurer son indice mitotique.....	21
9 Démonstration de la génétique entourant les croisements de souches ayant un balancier génétique.....	28
10 Caractérisation additionnelle des volumes des lignées germinales des mutants <i>nar1</i> , <i>nar2</i> et <i>nar3</i> incubés à 25 °C.....	30
11 Caractérisation primaire des mutants issus de la mutagenèse du projet 1.....	31
12 Adaptée de Figure 2. <i>daf-2</i> couples nutritional cues to MPK-1 activation, in zone 1.....	36
13 Adaptée de Figure 1. The nuclear ratio ERK-nKTR design.....	39
14 Figure S1 de l'article.....	40
15 Phénotypes associés aux génotypes analysés dans le projet 2.....	44
16 Figure 1 de l'article. GSC MPK-1 activity does not correspond with GSC proliferation.....	45
17 Figure 2 de l'article. MPK-1B is germline-specific and promotes germline differentiation.....	48

18	Figure 1 et S1 du papier avec les résultats pour le mutant <i>mpk-1b</i>	54
19	Tableau résumé des résultats obtenus avec le nKTR.....	56
20	Figure 3 de l'article. Germline MPK-1B does not promote GSC proliferation	60
21	Figure 4 de l'article. Somatic MPK-1A promotes GSC proliferation non-autonomously	61
22	Figure S5 de l'article. Regulation of food attraction and body length by somatic MPK-1A.....	63
23	Figure 5 de l'article. Models for cell autonomous and non-autonomous MPK-1 functions	65

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CPEB	Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding
CS	Cellule(s) souche(s)
CSG	Cellules souches de la lignée germinale
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DIC	Contraste différentiel d'interférence ou Differential Interference Contrast
Dr.	Docteur
Dre.	Docteure
dsRNA	ARN double-brins ou Double-stranded RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Facteur de croissance épidermique ou Epidermal Growth Factor
EMS	Éthylméthanesulfonate
GFP	Protéine verte fluorescente ou Green Fluorescent Protein
IF	immunofluorescence
IGFR	Insulin-like Growth Factor Receptor
IM	Indice mitotique
KTR	Kinase Translocation Reporter
L1, L2, L3, L4	Stades larvaires 1 à 4
LED	Diode électroluminescente ou Light-emitting Diode
MQ	Milli-Q
NES	Nuclear Export Signal
nKTR	Nuclear Kinase Translocation Reporter
NLS	Nuclear Localisation Signal

OP50	Souche spéciale d' <i>E coli</i>
PH3	Phospho H3
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RNAi	ARN interférant ou RNA interference
SNP	Polymorphisme nucléotidique ou Single-nucleotide polymorphism
Unc	Mal coordonné ou Uncoordinated
u.a.	Unités arbitraires
WT	Sauvage ou Wild-type

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Historique de *C. elegans*

Malgré l'utilisation assez récente de cet organisme modèle, *C. elegans* a déjà permis de faire trois découvertes majeures qui ont été attestées par des prix Nobel.

Prix Nobel de 2002

En 2002, le prix Nobel de Physiologie ou Médecine a été accordé à Sydney Brenner, John E. Sulston et H. Robert Horvitz pour la découverte de l'apoptose [1-3]. Ces trois chercheurs ont également grandement contribué au développement de *C. elegans* comme organisme modèle.

Développement de l'organisme modèle

Sydney Brenner fut le directeur de recherche de John E. Sulston et Bob Horvitz. Ces trois ont ensuite à un certain moment supervisé tous les autres récipiendaires de prix Nobel. Avant d'étudier le *C. elegans*, Sydney Brenner voulait découvrir comment la séquence en nucléotides d'ADN spécifie la séquence d'acides aminés formant les protéines [1]. S'étant fait « scoopé » par des biochimistes, il a ensuite voulu résoudre le fonctionnement du système nerveux animal.

C'est ainsi que tout a commencé avec la recherche de Sydney Brenner, voulant trouver un organisme assez petit pour qu'il puisse être possible de l'observer dans son entièreté sous un microscope. De plus, cet organisme devait à la fois avoir un système nerveux simple et un petit nombre de cellules. Après de longues délibérations, il choisit le *C. elegans*. Une fois cela accompli, les études génétiques ont pu commencer. Dans son temps, l'analyse des gènes était limitée à la génétique, donc le seul moyen d'affirmer

qu'un gène était présent dans un organisme était d'y trouver un allèle mutant [1]. En effet, comme Gregor Mendel l'a dit : « We could not say that there was a gene for the character of tallness until dwarf mutants were discovered suffering from a heritable lack of tallness » [4]. La mutagenèse aléatoire, méthode de travail se basant sur ce principe, est encore souvent employée de nos jours par les laboratoires travaillant avec *C. elegans*.

Découverte du « live » et du « linéage »

John E. Sulston, quant à lui, a inventé un moyen efficace pour immobiliser les vers sous un microscope sans les tuer ou nuire à leur développement. Cette technique est celle qu'on utilise pour faire nos « live », elle est décrite en détail dans la section « Préparation des nématodes ». C'est alors qu'il a pu observer par DIC (Differential Interference Contrast) des divisions cellulaires et ainsi les étudier [6]. Ensemble, H. Robert Horvitz et John E. Sulston ont élucidé le linéage du *C. elegans* mâle et hermaphrodite [7-9]. Plus récemment, il a participé au séquençage du génome de *C. elegans* [5].

Découverte de l'apoptose

Ils ont aussi pu observer la mort cellulaire; l'apoptose. C'est alors qu'ils ont pu étudier ce qui programme la mort cellulaire dans un organisme *in vivo*. Lorsque Bob Horvitz est parti du laboratoire de Sydney Brenner, il a poursuivi ses recherches et a réussi à reconstruire la cascade de signalisation principale qui programme l'apoptose [10].

Prix Nobel de 2006

En 2006, le prix Nobel en Physiologie ou Médecine a été accordé à Andrew Fire et Craig Mello pour la découverte du phénomène RNAi [11,12]. Ces deux chercheurs ont aussi trouvé un moyen pour micro-injecter *C. elegans* [13]. Parce que l'injection se fait directement dans la gonade, qui est syncytiale, beaucoup de progénitures sont influencées par une seule injection [14]. Cette technique est toujours abondamment utilisée par les laboratoires de *C. elegans*. Par contre, cette technique demande beaucoup de temps et de pratique pour être maîtrisée.

Découverte du RNAi

La micro-injection a rendu plutôt facile l'injection de macromolécules dans un organisme vivant. Il était dès lors possible de visualiser l'effet d'une macromolécule étrangère sur le développement et la physiologie d'un organisme *in vivo*. Ensemble, Andrew Fire et Craig Mello ont découvert que l'ARN double-brin (dsRNA) possède la capacité de nuire, voire de rendre nulle, l'expression d'un gène [15]. Cela a rendu plus facile l'étude de gènes présélectionnés chez *C. elegans*.

Éventuellement, Lisa Timmons a nourri les vers avec des bactéries qui produisaient des dsRNA et cela a induit la même réponse qu'avec la micro-injection [16]. Ensuite, la même réponse a été obtenue par Hiroaki Tabara en trempant les vers dans la solution de dsRNA [17]. Ces techniques beaucoup plus faciles que la micro-injection sont maintenant abondamment utilisées dans les laboratoires de *C. elegans*. Craig Mello s'est alors penché sur le mécanisme derrière ce procédé dans *C. elegans* pour plus tard l'élucider [18-20]. Il s'agit des mécanismes entourant les complexes enzymatiques RISC, dont les Argonautes, et l'enzyme Dicer.

Prix Nobel de 2008

En 2008, le tiers du prix Nobel en Chimie a été accordé à Martin Chalfie [21], un postdoctorant du laboratoire de Sydney Brenner. Il n'a pas découvert la protéine verte fluorescente (GFP), mais c'est le chercheur qui a eu l'idée d'utiliser la GFP pour visualiser des protéines dans des animaux vivants plutôt qu'à l'intérieur de tissus fixés, comme c'est le cas avec des anticorps [22].

Vu que *C. elegans* est transparent, il a été l'organisme de choix pour le faire [23]. Par exemple, cela a permis de placer un promoteur spécifique devant la GFP pour en induire l'expression vérifiable dans le tissu ciblé [24]. Aujourd'hui, la GFP et ses dérivés sont excessivement utilisés dans presque tous les domaines de recherche en biologie cellulaire et moléculaire, d'où l'importance de cette découverte.

But du laboratoire Narbonne

Dans le laboratoire Narbonne, nous travaillons à élucider les mécanismes liés à la prolifération des cellules souches (CS) en se servant de l'organisme modèle *C. elegans*. L'un des buts à long terme est de mieux comprendre les causes du cancer. D'abord, qu'est-ce qu'une CS? Chez les mammifères, les CS sont catégorisées en plusieurs types selon leur potentiel de différenciation soit totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent et unipotent.

Cellules souches

Les CS totipotentes possèdent le plus grand potentiel de différenciation. En effet, c'est la CS qui résulte de la fertilisation d'un ovocyte par un sperme. Ces cellules se développent en blastocyste et chez les mammifères, ce sont les cellules qui se retrouvent à l'intérieur du blastocyste qui sont les CS pluripotentes [25]. Ces CS pluripotentes ou CS embryonnaires deviendront des CS adultes multipotentes de l'ectoderme, du mésoderme ou de l'endoderme. Dans leur lignée spécifique, elles deviendront oligopotentes et ne pourront que se différencier en quelques types de cellules. Ensuite, elles deviendront unipotentes qui est le stade le plus strict et spécifique de différenciation. La progéniture des CS terminera sa différenciation pour éventuellement devenir des cellules faisant partie d'organes fonctionnels, tandis qu'un certain nombre de CS préserveront leur potentiel pendant toute la vie de l'organisme, afin de permettre le renouvellement et la réparation des tissus [26] (Fig. 1). Bref, une CS est une cellule capable de se différencier en un ou plusieurs type(s) de cellule(s).

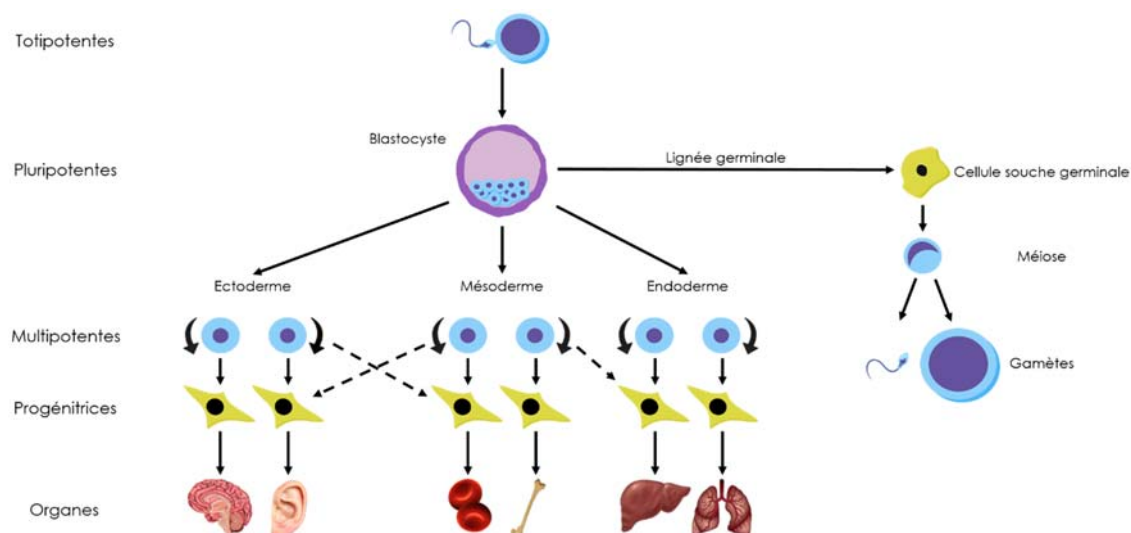


Figure 1 : Stades de développement des cellules souches chez le mammifère.

Régulation des cellules souches

Maintenant, comment la prolifération des CS est régulée? Le stade majoritaire dans lequel se retrouvent les CS est en réalité la quiescence. En présence de certains signaux, elles en sortent et se dédoublent en procédant à une mitose. La mitose est le processus de division d'une cellule mère qui crée deux cellules filles [27]. Lorsqu'on subit une lésion, comme quand on se coupe avec un couteau, certaines cellules du tissu seront détruites et devront être remplacées par de nouvelles. C'est alors que des signaux de croissance sont envoyés aux CS en quiescence pour qu'elles se remettent à produire des cellules filles qui se différencieront afin de réparer le tissu lésé.

Ces signaux sont véhiculés par différentes molécules se liant à leurs récepteurs spécifiques à la surface des CS, tels que le facteur de croissance épidermique (EGF) ou l'insuline [28]. L'activation des récepteurs spécifiques à ces facteurs induit une cascade moléculaire qui promeut la croissance et la prolifération cellulaire.

À plus long terme, des modifications épigénétiques, soit l'ajout ou le retrait de marques sur l'ADN ou au niveau des histones, prennent place. Le but de ces modifications est de changer l'accès à certaines parties de l'ADN de manière spécifique et parfois permanent [29,30].

Avantages de *C. elegans*

Pourquoi utiliser *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) pour comprendre la régulation de la prolifération des CS? *C. elegans* est un nématode transparent d'environ 1 mm de long qui nous procure plusieurs avantages assez uniques [31].

Hermaphrodisme

Premièrement, *C. elegans* est normalement hermaphrodite; c'est-à-dire qu'il autoféconde ses propres ovocytes avec son propre sperme. Cela permet des manipulations génétiques plus aisées qu'avec d'autres organismes modèles tels que la souris [32]. Cela permet également de travailler assez facilement avec des mutations sur des gènes capitaux à la survie ou au développement embryonnaire. De plus, avec *C. elegans* de tels génotypes se maintiennent très facilement contrairement à, par exemple, des souris où on serait obligé de les recroiser sans cesse pour éviter de perdre un allèle [33]. Donc, le principal avantage de travailler avec un organisme modèle hermaphrodite vient du fait qu'un croisement incluant ces types de gènes, exécuté avec un autre organisme, serait assez long à réaliser [33]. De plus, les souches résultantes seraient beaucoup plus difficiles à maintenir [33]. Dépendant de notre compétence, la plupart des croisements sont réalisable en moins d'un mois avec *C. elegans* [34].

Cependant, *C. elegans* n'est pas un hermaphrodite obligatoire. En effet, dans la nature on retrouve des mâles. Au lieu de produire des ovocytes, ceux-ci continuent de produire du sperme même une fois adulte. La différence génétique de ceux-ci est que l'hermaphrodite possède six paires de chromosomes, dont deux chromosomes X, tandis que le mâle n'a qu'une seule copie du chromosome X [35]. Dans la nature, cet état permet le transfert inter-individuel du bagage génétique, ce qui augmenterait la diversité génétique de l'espèce. Le but des mâles serait donc de faciliter la capacité adaptatrice de l'espèce et favoriser ainsi sa survie. Ainsi, dans la nature les mâles apparaissent sporadiquement, alors qu'en laboratoire il nous est possible de les produire en grande quantité facilement.

Notre manière de procéder est de forcer des erreurs de ségrégation des chromosomes des *C. elegans* hermaphrodite ayant le génotype désiré. Pour ce faire, il faut faire un « heat shock », ce qui stresse les vers [37]. Cela se fait en mettant des vers L4 à 30 °C pendant quatre à six heures à l'incubateur. Après, il devrait y avoir des mâles dans la génération suivante. Ensuite, il s'agit simplement de les utiliser pour un croisement et/ou de les recroiser avec des vers de leur souche correspondante afin de les conserver sur plusieurs générations. Toutefois, il existe des souches telle la WT Hawaïenne pour lesquelles les mâles se conservent sans manipulations additionnelles. J'ai utilisé cette souche dans mon projet 1.

Transparence

Deuxièmement, la cuticule du *C. elegans* est transparent. Cela rend possible l'observation du développement des CS et d'organes en temps réel dans un organisme vivant. En plus, en étiquetant des cibles spécifiques avec des protéines fluorescentes, on peut facilement observer l'expression de ces transgènes *in vivo* sous un microscope à fluorescence [22,23].

Croissance rapide

Troisièmement, *C. elegans* croît à 20 °C de l'oeuf à l'adulte en à peine trois jours [37]. Concernant le cycle de vie de *C. elegans*, voici un résumé [32]. À 20 °C, l'embryogenèse dure environ seize heures. Immédiatement après sa fertilisation, l'embryon forme une coquille imperméable. C'est alors que l'embryon devient indépendant de sa mère. Les embryons sont pondus au stade de 24 cellules. La larve hermaphrodite dite L1 éclot une fois qu'elle atteint 558 cellules. On utilise plutôt le terme « noyaux » pour la lignée germinale d'un *C. elegans* hermaphrodite ou mâle, car celle-ci est syncytiale. C'est-à-dire que la mitose des CS germinales ne se fait pas complètement et que la membrane et le cytoplasme des cellules filles restent connectés. Cela permet, entre autres, une propagation de l'information plus rapide, car celle-ci se propage directement d'un cytoplasme à l'autre sans membranes à traverser. En effet, *C. elegans*

possède une lignée germinale particulière. Elle est englobée d'un tube en forme de U et leur gonade est composée de deux bras, soit un antérieur et un postérieur. Chez une souche sauvage ou « wild-type » (WT), chaque bras de gonade produit jusqu'à 150 spermatozoïdes du stade L1 à L4. Une fois adulte, le ver ne produit plus que des ovocytes jusqu'à vider complètement ses réserves de sperme. Donc, chaque adulte hermaphrodite produit entre 200 et 300 œufs [37]. Par contre, ils peuvent produire plus de progénitures s'il y a fécondation par un mâle.

Stades larvaires

Le premier stade larvaire s'étend sur environ seize heures. Ensuite, la larve mue entre chaque stade de L1 à L4. Les stades L1-L4 durent environ huit à douze heures chacun. Les vers deviennent ensuite adultes et se mettent à produire des ovocytes. Ceux-ci mûrissent, sont fécondés par le sperme et sont pondus durant une période d'environ deux à trois jours jusqu'à ce que l'animal épuise sa réserve de sperme (Fig. 2). Par contre, si l'animal subit un stress au stade L1, par exemple un manque de nourriture, il entre dans un état alternatif au lieu d'entrer au stade L3. La larve devient alors « dauer », un état très résistant au stress [31]. C'est d'ailleurs l'état naturel de *C. elegans* dans la nature, puisque la nourriture n'y est pas toujours abondante comme sur nos pétris. En outre, si la larve éclot dans un environnement sans nourriture, elle demeure alors en mode « L1-arrest ». Ce mode lui permet de retarder sa croissance et de résister plus facilement aux stress causés par l'environnement [7]. Cette propriété permet qu'on puisse conserver les larves et les souches dans l'azote liquide à -196 °C [38].

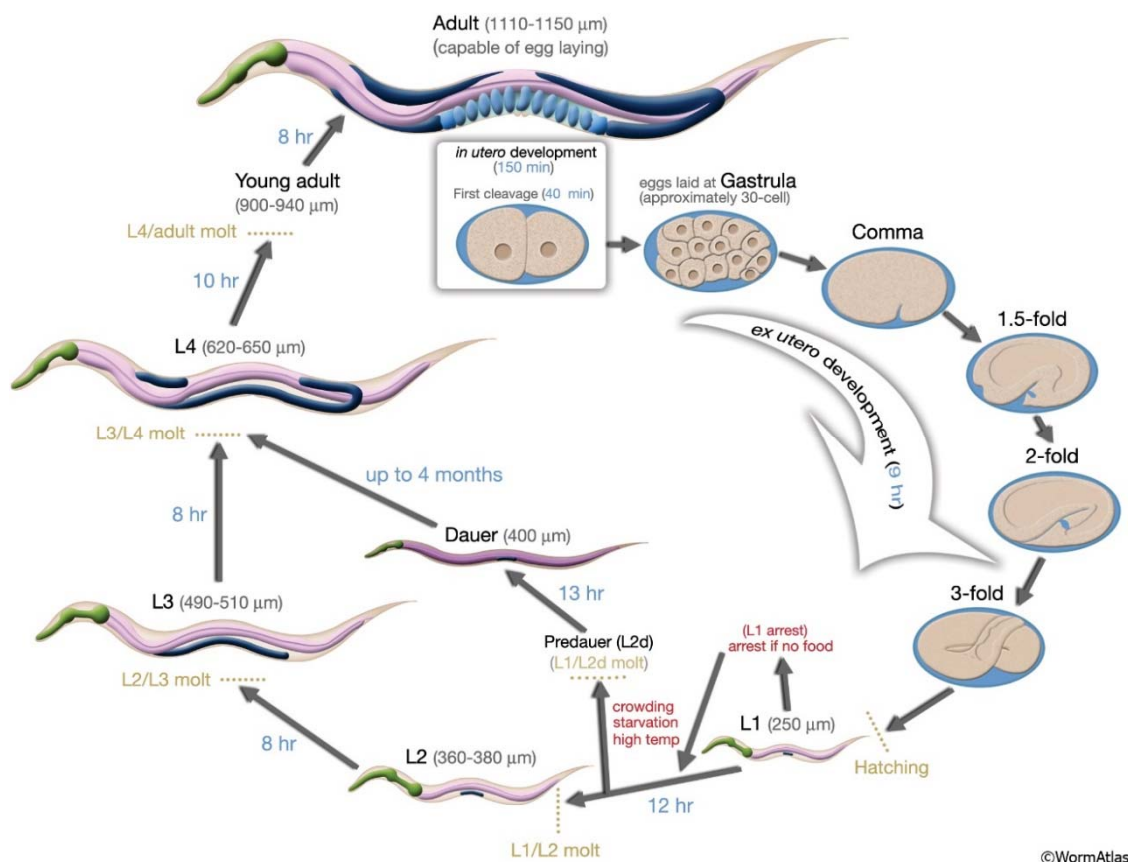


Figure 2 : Stades de croissance et cycle de vie de *C. elegans*.

Formation de la lignée germinale

La lignée germinale du *C. elegans* est visible grâce à la cuticule transparente du ver. La formation de cette lignée germinale a été caractérisée par la Dr. Judith Kimble et le Dr. David Hirsh en 1979 [39]. Lorsque l'œuf éclot, les gonades primitives se composent de quatre cellules : Z1, Z2, Z3 et Z4. Les cellules Z1 et Z4 formeront les tissus somatiques de la gonade, incluant les cellules de la gaine et les cellules niches. Z2 et Z3 sont deux CSG qui généreront la lignée germinale durant la croissance de l'animal. Au stade adulte, chaque bras de gonade contient environ mille cellules germinales, incluant environ 200 CSG. Au stade L2, les cellules niches commencent à migrer. En partant du centre du ver, partie ventrale et au niveau de l'utérus, elles partent chacune de leur côté sur la longueur du ver. Au stade L3, les cellules niches se tournent pour migrer dorsalement. Une fois rendues à la membrane dorsale, elles tournent une deuxième fois vers le centre

du ver. Ces deux virages forment le U de la gonade. Les cellules niches continuent à migrer dans cette direction jusqu'à l'atteinte du centre du ver durant le stade L4. Elles s'arrêtent de migrer au stade adulte une fois qu'elles se sont chevauchées au centre du ver au-dessus de la vulve (Fig. 3) [40]. En effet, comme on l'observe dans mes figures, les extrémités distales des gonades se chevauchent.



Figure 3 : Migration des cellules Z1 et Z4.

The U-shaped migratory path of the distal tip cell shapes the hermaphrodite gonad arm during larval development. Schematic representation of a posterior gonad arm shows the distal tip cell (crescent shapes) at different stages of migration. Arrows depict the direction of distal tip cell migration and colored arrows show the extent of distal tip cell migration during each phase and larval stage: phase 1/larval stage 2 (red), phase 2/larval stage 3 (yellow) and phase 3/larval stage 4 (blue). Adapté de Wong M. C. et Schwarzbauer J. E. 2012 [41]

Cellule niche

Au bout distal de chaque gonade se tient une cellule niche. Cette cellule mésenchymale (Fig. 4) en forme de méduse englobe le bout distal de la gonade jusqu'à la zone de transition des CSG. Cette cellule régule la prolifération et la différenciation des CSG sous son contrôle. Pour ce faire, ses tentacules envoient un signal qui prévient la différenciation des CSG. Ce signal passe par la molécule LAG-2 exprimée à la surface de la cellule niche qui interagit avec les récepteurs GLP-1/Notch des CSG. Cette interaction active la séparation du domaine Notch intracellulaire (NICD) qui migre dans le noyau puis forme un complexe avec LAG-1/CBF-1 et LAG-3/SEL-8 (Fig. 5). Le processus qui régule la translocation du NICD du cytoplasme au noyau nous est inconnu [42]. Le complexe formé interagit avec d'autres effecteurs provenant d'autres cascades de signalisation pour réprimer et activer certains promoteurs, recruter des histones acétyltransférases (HATs) et

remodeler la chromatine. Par exemple, cela active les protéines FBF1 et FBF-2. Les doubles-mutants *fbf-1 fbf-2* échouent à la maintenance des CSG lesquels entrent en méiose et se différencient [43,44]. Nous savons que FBF-1 et FBF-2 ciblent des mRNAs importants pour la régulation du cycle cellulaire et de la mort cellulaire (Ras/MAPK, Notch, Akt, Wnt, Hedgehog, etc). Par contre, seulement celui qui encode pour ERK/MAPK a été validé dans les CSG de *C. elegans* et les CS embryonnaires humaines [45]. Ultimement, la cascade de signalisation initiée par LAG-2 et Notch a pour but d'empêcher la prolifération et la différenciation des CS, sans empêcher leur renouvellement mitotique.

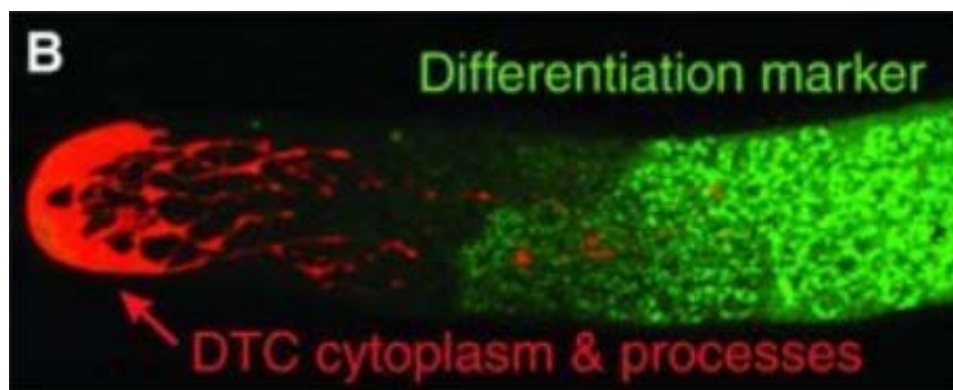


Figure 4 : Visuel d'une niche de *C. elegans*.

DTC (red), highlighted with cytoplasmic GFP, shows cell body at the distal end and DTC processes extending proximally. The onset of germline differentiation is observed using the GLD-1 marker (green). Micrograph from Karla Knobel (Kimble lab). Adaptée de Kimble J. et Seidel H. 2013 [46].

Croissance

En outre, la croissance de la lignée germinale est régulée par les stress subis par les larves en croissance. Une larve L1 qui éclot dans un milieu pauvre en nourriture entre dans une phase appelée « diapause ». Leurs CSG arrêtent alors leur cycle cellulaire au stade G2/M [47]. Cette quiescence est régulée par *daf-18/PTEN* et *AMPK* [47]. À l'inverse, la découverte de nourriture fera sortir la larve L1 de sa diapause et passer en stade L2. Une fois aux stades L1 et L2, si un manque de nourriture survient, alors la larve entre dans le stade « dauer ». Ce stade ressemble au stade de diapause L1 mais fait en sorte que les larves peuvent se déplacer plus rapidement, en plus de résister beaucoup mieux à

tous types de stress. Par contre, l'entrée en stade dauer est régulée différemment. Premièrement, l'Insulin/IGF-like signaling (IIS) et la protéine kinase ribosomale S6 ont un effet de régulation dans les CSG [48,49]. Deuxièmement, la cascade de signalisation TGF- β régule la balance entre prolifération et différenciation dans la cellule niche [50]. La redécouverte de nourriture fera muer la larve dauer en L4, qui reprendra alors sa croissance vers le stade adulte.

Dans un ver adulte manquant de nourriture, les divisions cessent dans les CSG [51]. Les cellules en méiose d'un tel ver continuent de croître. Si ce ver manque de nourriture pendant une très longue période, alors sa production en ovocytes est grandement diminuée [53,54]. Au retour de la nourriture, ce ver régénèrera complètement sa lignée germinale et continuera à pondre à condition d'avoir encore du sperme [53,54].

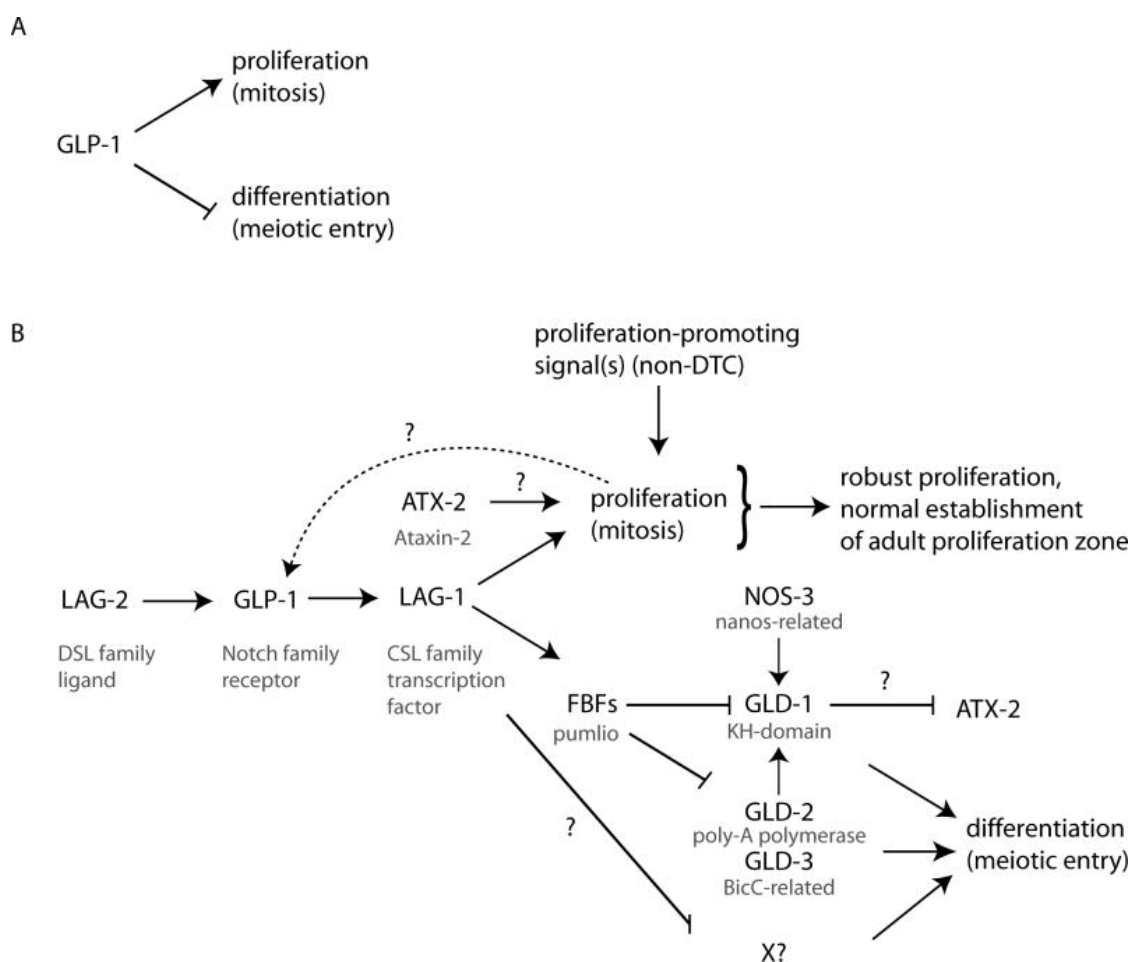


Figure 5 : Voie de signalisation de la différenciation des CSG.

Diagrams of relationships of selected proposed interactions between signaling pathways that influence proliferation and differentiation. A: simple relationship between GLP-1 activity and germ cell fate. B: Additional interactions downstream of the GLP-1/Notch signaling pathway. Protein families/orthologs are indicated in gray. Adaptée de Hubbard E. J. A. 2010 [52].

Différentiation

Chez *C. elegans*, la zone distale de la gonade contient environ 150-200 CSG [55]. Ces CSG sont maintenues en mitose par la cascade de signalisation initiée par GLP-1/Notch. (Fig. 5) L'entrée en méiose est régulée par les protéines GLD-1/QKI, GLD-2/TENT2 et GLD-3 [56,57]. Celles-ci font des interactions avec les FBF. Une fois la CS sortie de la zone niche et entrée en méiose, elle progresse dans le pachytène en étant poussée proximale par la formation de nouvelles CSG. Tout au long du pachytène, l'activité de la voie MAPK est requise, ainsi que plusieurs gènes dont *gld-1/QKI* et *cul-1/CUL1* (Fig. 6). La cullin est requise pour le fonctionnement du cycle cellulaire, qu'on croit plus précisément pour le passage des phases G1 à S, et interagit avec les huit SKR/SKP [58].

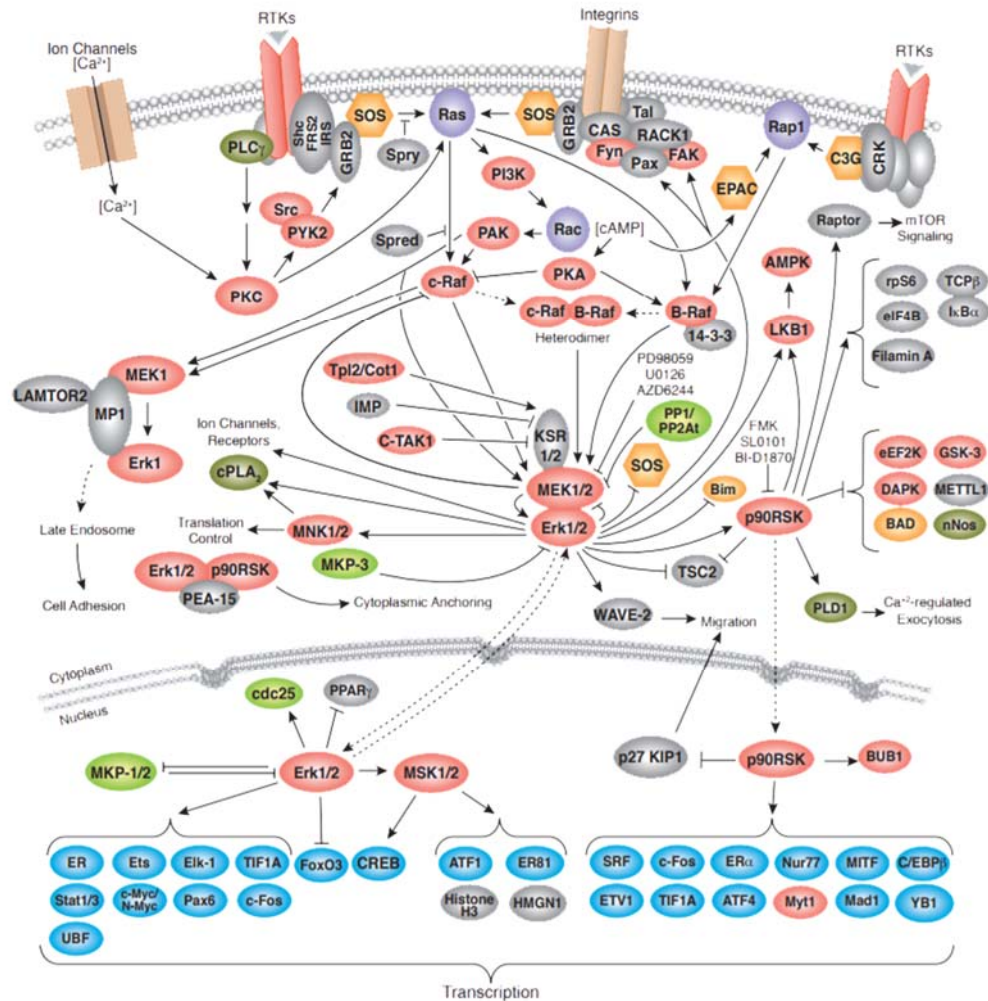


Figure 6 : Voie MAPK de croissance et différenciation chez l'humain [82].

Dans un *C. elegans* hermaphrodite WT, la spermathèque se remplit lors des stades larvaires. Au stade adulte hermaphrodite, le ver ne produit que des ovocytes alors que l'adulte mâle ne produit que du sperme. Il a été prouvé qu'un ver hermaphrodite ayant une perte de fonction du gène *fog-1* ou *fog-3* ne produit pas sperme, mais des ovocytes à la place [59]. En effet, la décision de se transformer en sperme/ovocyte se fait dès l'entrée en méiose d'une CSG. Par contre, peu importe l'âge du ver, ses CSG en zone niche gardent toujours leur potentiel de générer des spermatozoïdes ou des ovocytes [60]. Il va sans dire que dans les CSG de *C. elegans*, les décisions mitose/méiose et sperme/ovocyte ne sont pas les mêmes. Quoique celles-ci sont tout de même liées et ont lieu en même temps.

Maturation de l'ovocyte

Dans un ver hermaphrodite WT en conditions idéales, sa lignée germinale produit du sperme jusqu'à remplir sa spermathèque durant les stades larvaires. Ensuite, elle se met à ne produire que des ovocytes jusqu'à la fin de la vie du ver. Mais avant d'être fécondé, l'ovocyte doit devenir mature. Chez *C. elegans*, la maturation d'un ovocyte réfère au passage de diacinèse à la métaphase 1. Cette phase est déclenchée par les « Major Sperm Proteins » (MSP) qui induisent l'activation de la voie MAPK dans l'ovocyte. Les protéines OMA-1 et OMA-2 sont requises pour cette étape [61]. En plus des MSP, LIN-3/EGF active son récepteur LET-23 dans la spermathèque et induit sa dilatation. De plus, l'état de maturation et de grossissement de l'ovocyte déclenche la contraction des cellules somatiques des « sheath cells », ce qui induit l'ovulation. Lors de l'ovulation, les protéines OMA-1 et OMA-2 sont également requises [61]. L'ovulation pousse et tire l'ovocyte dans la spermathèque. La fusion du sperme avec l'ovocyte a donc lieu dans la spermathèque. Chaque ovocyte ne peut être fécondé que par un seul sperme. Il s'agit ici d'un mécanisme toujours inconnu. La fertilisation de l'ovocyte requiert certains gènes tels que *spe-13*, *spe-9* et *trp-3* qui codent pour des canaux de calcium et d'ions cations [61]. La fertilisation est aussi un mécanisme peu connu. Une fois que le zygote a terminé sa méiose, l'embryogenèse commence et la coquille de l'œuf se forme. L'œuf est pondu au stade d'environ 30 cellules. Par un adulte hermaphrodite WT, un œuf est pondu toutes les 20 minutes environ jusqu'à déplétion de sa réserve de sperme.

Homologie avec le génome humain

Le génome de cet organisme modèle a une très forte homologie avec le génome humain et a, bien évidemment, été séquencé au complet [37]. La méthode conventionnelle de travail avec *C. elegans* est de muter un ou des gène(s), de vérifier le ou les phénotype(s) induit(s) et de conclure sur la fonction du ou des gène(s) muté(s).

Types de criblage génétique

En outre, il existe plusieurs techniques efficaces mutagènes ou transgéniques afin de modifier le génome de *C. elegans*. Pour produire des lignées transgéniques, on peut utiliser les techniques du bombardement [62], de la micro-injection conventionnelle générant des extra-chromosomes [63] et du CRISPR/Cas9 [64]. Pour faire de la mutagenèse, la méthode de prédilection est de les baigner dans un produit chimique comme l'éthylméthanesulfonate (EMS) [65]. Alternativement, l'ARN interférant (RNAi) peut être utilisé pour faire des criblages génétiques plus ciblés [66,67].

Le criblage à l'EMS est dit conventionnel ou aléatoire, alors que le criblage au RNAi est dit inverse. Le but d'un criblage conventionnel est de muter des gènes aléatoirement afin de produire des vers ayant un phénotype recherché. L'objectif d'une telle approche est de découvrir de nouvelles cibles dont le rôle est de prévenir ce phénotype. L'approche conventionnelle permet autant de trouver des gènes d'intérêts pour le phénotype si leur expression est arrêtée, diminuée ou augmentée, tandis que l'approche inverse par RNAi fonctionne seulement en arrêtant l'expression des gènes.

Pour l'approche inverse, deux bibliothèques de bactéries produisant les ARN double-brins (dsRNA) ont déjà été créées [25]. Celles-ci couvrent presque en entier les quelques 20 000 gènes de *C. elegans*. À titre informatif, le RNAi chez *C. elegans* se fait en laissant les vers manger les bactéries produisant les dsRNA, gène par gène. Ensuite, les vers internalisent les dsRNA dans leurs cellules, ce qui induit le silencement du gène ciblé, et peut alors potentiellement provoquer un phénotype recherché, lorsque le gène ciblé est impliqué dans le processus de ce phénotype.

Maintenance de *C. elegans*

Finalement, *C. elegans* est facile et coûte peu à maintenir. De plus, une technique pour les transférer stérilement d'une gélose à l'autre a été développée dans les tous débuts de la recherche avec cet organisme. Il s'agit de « pick » les vers avec une pipette de verre tronquée dans laquelle un fil de platine y a été immobilisé puis modelé à notre guise. Le platine est un matériau efficace dans ce rôle, car lorsqu'il est exposé à une flamme,

il chauffe rapidement, puis refroidit aussi rapidement après qu'on l'en retire [37]. Cet outil permet de transférer les vers stérilement sans les endommager avec de la pratique bien sûr.

En plus, la maintenance de *C. elegans* est très peu coûteuse, puisqu'il est cultivé et conservé sur géloses d'agar. Normalement, ils sont conservés à 15 °C ou 20 °C dans des incubateurs. Ces vers se nourrissent d'une souche spéciale d'*Escherichia coli* (*E. coli*) du nom d'OP50 qui est utilisé par toute la communauté scientifique travaillant avec *C. elegans*. Cette souche spéciale ne produit plus d'uracile, ce qui fait en sorte que ces bactéries ne peuvent plus croître en s'empilant. Cela prévient la surcroissance du tapis bactérien sur la gélose. Aussi, cela nous permet de mieux voir les vers et leur permet d'aspirer leur nourriture plus facilement [37]. En outre, le fait que la même diète est utilisée par tous les laboratoires réduit grandement la variabilité des expériences reproduites d'un laboratoire à l'autre.

CHAPITRE II

PROJET 1 : LE MÉCANISME RÉTROACTIF DE LA PROLIFÉRATION DES CS

Origine du projet

Ce projet origine d'expériences que le Dr. Narbonne a lui-même conduites lors de son 2^e post-doctorat. Il avait montré que l'accumulation d'ovocytes entraîne l'inhibition de la prolifération des cellules souches de la lignée germinale (CSG) chez le *C. elegans* hermaphrodite. Il a d'abord fait l'indice mitotique (IM) du mutant *fog-1* et a remarqué une diminution radicale du rythme de prolifération de cette souche comparée au WT. Pour plus de détails concernant le mutant *fog-1*, voir la section des génotypes analysés du projet 2.

Il a ensuite généré les doubles-mutants *fog-1; par-4, fog-1; daf-18, fog-1; aak-1 et fog-1; aak-2*. Le choix des gènes s'est fait à l'aide d'expériences ultérieures [68]. Il a remarqué que le phénotype d'IM bas causé par le manque du gène *fog-1* est récupéré par le manque des gènes *par-4/LKB1*, *daf-18/PTEN* et *aak-1/AMPK α_1* , mais pas *aak-2/AMPK α_2* . Cela signifie qu'*aak-2/AMPK α_2* n'est pas requis pour inhiber la prolifération des CSG, tandis que *par-4/LKB1*, *daf-18/PTEN* et *aak-1/AMPK α_1* le sont. Les gènes *aak-1/AMPK α_1* et *aak-2/AMPK α_2* sont deux homologues de la sous-unité alpha d'AMPK, mais ne sont pas requis pour les mêmes raisons [47,69]. Ces mutations préviennent également la quiescence, la rétention et l'accumulation des ovocytes en l'absence de sperme. Afin de pouvoir visualiser l'accumulation ovocytaire induite par ces mutations dans un animal hermaphrodite produisant du sperme ayant un IM nul, il a décidé d'observer ce qui se produit lorsqu'on mute ces gènes dans le double mutant *oma-1; oma-2*. Les protéines doigt de zinc OMA-1 et OMA-2 sont redondantes et requises pour la maturation de l'ovocyte. Sans ces protéines, l'ovocyte ne peut pas devenir assez mature pour être activé par le sperme. Donc, dans les doubles-mutants *oma-1; oma-2*,

les ovocytes n'entrent pas dans la spermathèque et ne sont pas ovulés, ce qui fait en sorte qu'ils s'accumulent, comme Dr. Narbonne l'a observé [68] (Fig. 7C).

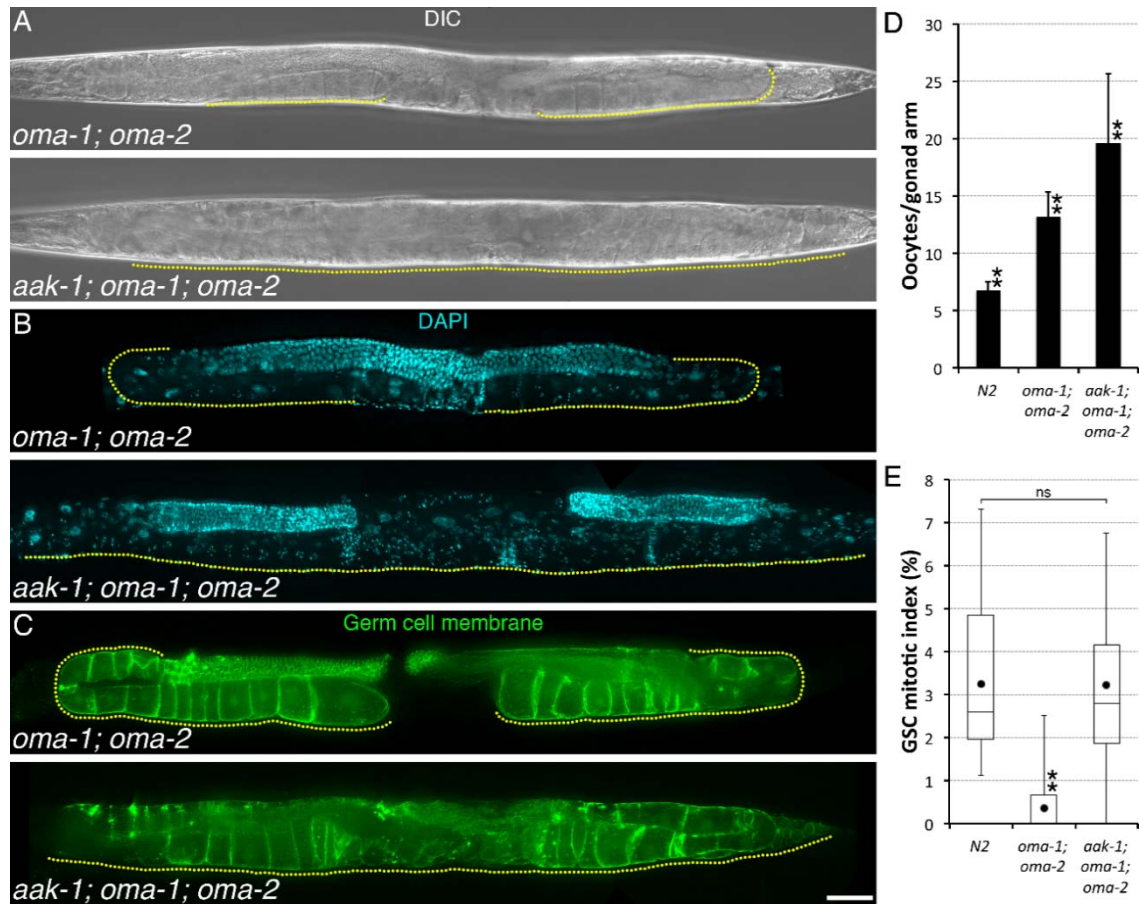


Figure 7: Adaptée de Figure 2 [42]; AAK-1 couples GSC proliferation to oocyte accumulation.

(A-C) Representative (A-B) A1 or (C) A2 animals of the indicated genotypes imaged using (A) Differential Interference Contrast (DIC), (B) DAPI (DNA; blue), or (C) *mex-5p::mNeonGreen::PLCδ-PH* (Germ cell membrane; green). A yellow dotted line delineates the area occupied by oocytes. Anterior is to the left and dorsal, up. Scale bar: 50 μ m. (D) Average number (\pm standard deviation) of diakinesis-stage oocytes per gonad arm in A1 hermaphrodites of the indicated genotypes. n, 24–28. (E) The GSC MIs of A1 hermaphrodites of the indicated genotypes were determined. n, 18–23. Dots mark averages, open boxes and brackets represent the whole sample, divided in quartiles. (D-E) Two asterisks indicate statistical significance ($P < 0.05$; One-way ANOVA with Holm multiple comparisons) to all other samples. ns, not significant (A-E) Alleles: *aak-1*(tm1944), *oma-1*(zu405te33), *oma-2*(te51).

Indice mitotique

Pour *C. elegans*, nous utilisons une méthode d'immunofluorescence (IF) afin de mesurer le rythme de prolifération de la lignée germinale d'un animal; c'est l'IM [28].

Pour colorer les lignées germinales des animaux, il faut d'abord les disséquer. La dissection se fait sur le « coverslip » et doit durer au maximum cinq minutes pour éviter que les cellules entrent en état de stress suite aux chocs imposés par la dissection. Lorsqu'on coupe la tête d'un *C. elegans* entre le pharynx et la courbe en U du bras de gonade antérieur, toute la gonade sort d'elle-même. En disséquant 20 vers, il y aura de 20 à 40 bras de gonades sur la lame. Il suffit alors de les monter sur une lame qui sera congelée à -80 °C. Ensuite, après un trempage immédiat de la lame dans le méthanol froid, on doit « freeze crack » en pichenettant le « coverslip ». Cela a pour effet de briser les membranes des tissus et cellules se trouvant sur la lamelle. Par la suite, on fixe les gonades au méthanol (-20C), puis au paraformaldéhyde, et on procède à la coloration. Celle-ci se fait à l'aide de quatre anticorps et du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Les anticorps sont : un anti-HIM-3 de lapin, un anti-Phospho H3 (PH3) de souris, un anti-anti-lapin de chèvre fusionné à l'Alexa 488 (vert) et un anti-anti-souris de chèvre fusionné à l'Alexa 546 (rouge) (Fig. 8).

HIM-3 est une protéine qui n'apparaît que dans les CS différenciées et PH3 est une modification à l'histone H3 qui n'est présente que pendant la phase mitotique de la division cellulaire. Donc, HIM-3 permet de visualiser la fin de la zone niche et PH3 permet de localiser les CS en cours de mitose. Le DAPI se lie à l'ADN et colore en bleu le noyau de toutes les cellules, dont celles de la lignée germinale. Par exemple, chez un ver WT adulte hermaphrodite sur une acquisition d'IM, toutes les cellules de la lignée germinale sont colorées en bleu, quelques cellules en pleine division sont colorées en vert et uniquement les cellules hors de la zone niche et différenciées sont colorées en rouge (Fig. 8). Par traitement informatique, l'IM est calculé en divisant les CS en division par le nombre total de CS non-différenciées toujours dans la niche. En comparant les IM des souches WT et mutantes, on peut alors discerner les différences de rythme de prolifération entre les souches [70].

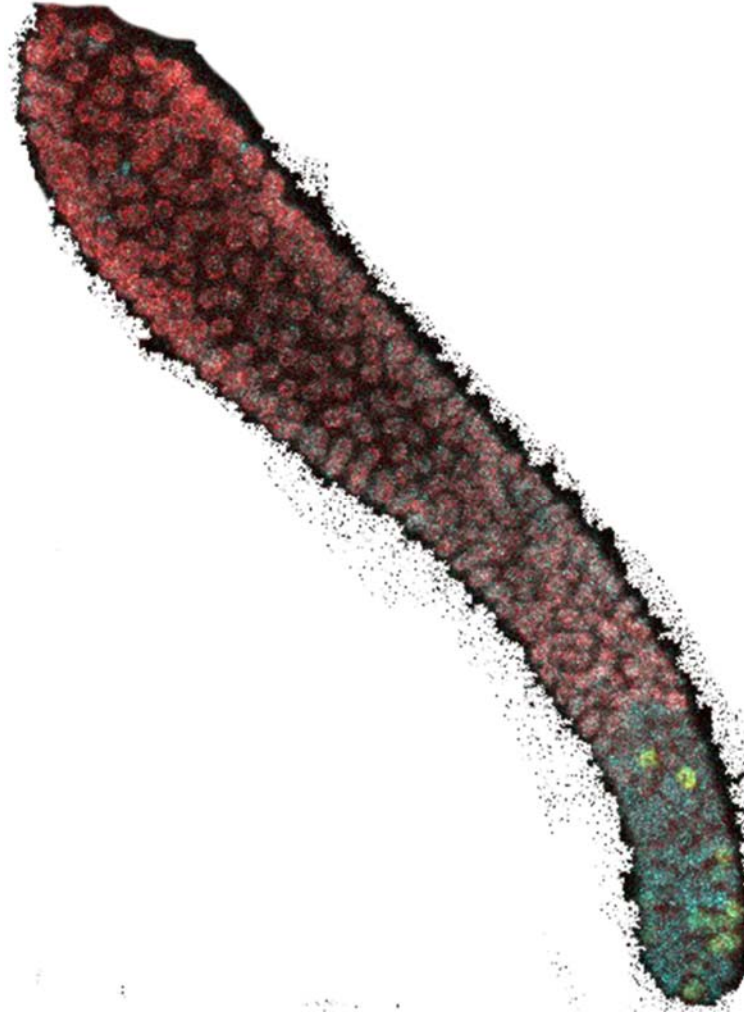


Figure 8 : Exemple d'une gonade extrudée et colorée par immunofluorescence afin de mesurer son indice mitotique.

Toutes les CS sont colorées bleue par DAPI. Les CS rouges colorées par Alexa 546 avec un anti-HIM-3 sont en méiose et présentent après la zone niche. Les CS vertes colorées par Alexa 488 avec un anti-PH3 sont en division mitotique active et uniquement dans la zone niche.

Balanceur génétique « Unc »

En effet, la souche *oma-1; oma-2* homozygote est stérile, mais il nous est tout de même possible de l'utiliser, car *C. elegans* est hermaphrodite. La souche possède un balanceur génétique. Celui-ci utilisé (nT1) est un réarrangement chromosomal qui permet la maintenance de mutations létales dans des souches hétérozygotes [71]. Pour reconnaître quels vers de la souche sont mutants, le balanceur est muni d'un phénotype facile à repérer

sur les vers non-stériles. Lorsque le Dr. Narbonne a fait ses expériences, il a utilisé une mutation causant un phénotype « uncoordinated » (*unc*); des vers qui ne bougent pas bien. Puisqu'une seule copie est suffisante pour la maturation de l'ovocyte, ces vers sont superficiellement WT. Par contre, cela fait en sorte que seulement le tiers de leur progéniture est mutante et que l'autres deux tiers ne le sont pas.

Lignée germinale fluorescente

De plus, il a pu observer l'accumulation ovocytaire grâce au transgène *mex-5p::mNeonGreen::PLCδ-PH* qui rend les membranes des cellules de la lignée germinale verte fluorescente lorsque celles-ci sont exposées à une lumière bleue. Il a ensuite généré le triple-mutant *aak-1; oma-1; oma-2* et a remarqué que les ovocytes continuaient de s'accumuler indéfiniment dans cet animal ayant un IM tel un WT. Cela a confirmé qu'AAK-1/AMPKα est requis pour inhiber la prolifération des CSG suite à l'accumulation d'ovocytes.

Gènes connus du mécanisme rétroactif

À travers de nombreuses autres expériences, le Dr. Narbonne a trouvé qu'un manque des gènes *par-4/LKB1*, *par-5/14-3-3* et *daf-18/PTEN* pouvaient causer le phénotype d'hyper-accumulation ovocytaire dans le double-mutant *oma-1; oma-2*. Il restait donc à assembler ces protéines en un mécanisme complet en trouvant toutes les autres protéines impliquées grâce au phénotype que causerait leur perte dans le double-mutant *oma-1; oma-2*.

Hypothèse

Élucider le mécanisme rétroactif

C'est ici que je suis entré en jeu. La technique que j'ai utilisée afin de découvrir de nouveaux gènes impliqués dans le mécanisme rétroactif est la mutagenèse aléatoire. Avec *C. elegans*, celle-ci se fait assez aisément. Il faut préparer des populations de vers,

ici des doubles-mutants *oma-1; oma-2*, puis les plonger dans un produit chimique hypermutagène; l'EMS. Lors de la plonge, il faut absolument éviter de se contaminer avec l'EMS et prendre toutes les précautions nécessaires à notre sécurité; double-paire de gants, lunettes, hotte chimique, poubelle d'hydroxyde de sodium de concentration élevée, sarrau attaché par des élastiques aux poignets et idéalement être deux personnes. Évidemment, pour procéder à cette technique, on doit absolument avoir un phénotype à cribler. Donc, nous avons criblé pour des mutants causant l'hyper-accumulation ovocytaire, rendue facile à visualiser après avoir rendu fluorescente la lignée germinale du double-mutant *oma-1; oma-2*.

L'EMS

Mécanisme général

Nous avons choisi l'EMS, puisque c'est un agent mutagène très efficace et qui a déjà fait ses preuves sur *C. elegans* [65]. Son mécanisme d'action est de modifier des bases guanines en O-6-éthylguanines. Ces bases modifiées seront reconnues comme des thymines par la polymérase III. Lorsque celle-ci répliquera l'ADN, elle posera des adénines au lieu de cytosines devant ces guanines modifiées. Cela fera en sorte que la réplication de l'ADN se terminera avec des paires G-C qui seront devenues des paires A-T.

L'EMS produit également des transitions de paires T-A à A-T, mais les changements de paires G-C à A-T ont beaucoup plus d'impacts sur les protéines produites. Ces mutations aléatoires peuvent causer des diminutions ou des augmentations de l'activité des protéines produites par les gènes atteints.

Une fois la mutagenèse complétée, la progéniture de ces vers est isolée pour que la progéniture de cette autre génération soit criblée. Cela permet aux mutations subies de se retrouver à l'état homozygote. Évidemment, l'hyper-accumulation ovocytaire a été le phénotype criblé.

Déroulement des mutagenèses

Pour commencer ce projet, nous avons mutagenisé la souche balancée par le phénotype Unc. Au terme de la mutagenèse, plusieurs mutants ont été isolés. Mais, pendant que je faisais les acquisitions pour mieux les caractériser, j'ai remarqué qu'ils n'accumulaient plus d'ovocytes et que les vers non-Unc contenait et pondait des œufs. Bref, nos animaux n'étaient plus mutants pour *oma-1*; *oma-2*. En outre, j'ai refait une seconde fois cette même mutagenèse sans plus de succès.

En rétrospective, je crois que cela a été causé par le fait que le phénotype Unc n'était pas assez clair et que la sévérité du phénotype Unc des vers de la même souche sur le même pétri pouvait varier. En plus, lorsqu'un pétri contenant une souche Unc se contamine, il est très difficile de la décontaminer, puisque les vers non-stériles bougent difficilement hors des contaminations. Prenez en considération que la plupart des contaminations sont comme du bonbon pour les vers, il devient donc très difficile de s'en débarrasser.

Alors, pour toutes ces raisons, j'ai décidé de modifier le phénotype du balancier. J'ai donc changé le phénotype Unc en un phénotype de pharynx fluorescent par GFP. Donc, au lieu que les vers non-stériles de la souche soient Unc, ils eurent désormais un pharynx fluo.

Ainsi, j'ai refait la mutagenèse avec la souche double-mutante *oma-1*; *oma-2* balancée par un pharynx fluo en recherchant le phénotype d'hyper-accumulation d'ovocytes. Au terme de cette troisième mutagenèse, j'ai isolé cinq mutants avec succès, qui encore aujourd'hui, demeurent mutants. Nous avons nommé leurs allèles dysfonctionnels inconnus *nar1* à *nar5*.

Caractérisation des mutants et paramètres d'acquisition

D'abord, nous avons procédé à une caractérisation primaire des mutants. Avec l'aide de mon directeur de recherche, j'ai créé un essai afin de pouvoir comparer la quantité d'ovocytes accumulés des différentes souches entres-elles. Pour ce faire,

j'ai mesuré le volume de leur lignée germinale basé sur la fluorescence de leurs membranes.

Une fois les vers montés sur lame, les acquisitions ont été prises sur un stéréomicroscope à fluorescence inversé Zeiss [72] avec les paramètres suivants. Les vers ont été exposés 3,2 secondes avec une diode électroluminescente (LED) fluorescente à 488 nm et un « stack » comprenant tout le ver avec une distance entre les coupes de 2,50 μm ont été acquis.

Ces images ont été acquises avec un microscope confocal TCS SPS de Leica [73]. Les paramètres utilisés sont un objectif 10X à air avec un « pinhole » de 53 au zoom de 1.0. L'émission de la GFP a été acquise avec un laser à 488 nm à 4 % d'intensité avec un capteur PMT à 596 V de gain à 510 ± 15 nm à une résolution de 1024 x 1024 et 2,50 μm de distance entre les coupes. Pour pallier aux différents niveaux d'émission de GFP des différentes souches, j'ai fixé le maximum des images à 120 dans le logiciel Fiji avant de les redresser puis rogner.

Test de complémentation

Un test de complémentation sert à déterminer si un gène muté inconnu est le même gène qu'un mutant dont la mutation est connue (contrôle positif). C'est un test assez simple et très utilisé en études génétiques lorsqu'on travaille avec *C. elegans*. Par contre, cela ne fonctionne qu'avec des mutations récessives [37]. Donc, cela s'effectue en croisant une souche portant une mutation inconnue, issue d'une mutagenèse par EMS, avec une souche portant une mutation sur un gène dont on soupçonne être le gène inconnu. Évidemment, il faut que ces gènes confèrent aux vers le même phénotype. Effectivement, cela n'est pas un problème dans notre cas, puisque tous nos mutants accumulent des ovocytes. Ainsi, les vers hétérozygotes de la F1 suivant directement le croisement sont criblés pour ce phénotype.

S'ils ressemblent à des WT, alors la mutation inconnue n'est pas sur le même gène que le contrôle positif, car chaque mutant possède une version WT du gène de l'autre. On peut en conclure que le gène inconnu n'est pas celui testé.

S'ils présentent toujours un phénotype mutant, cela veut dire que la F1 possède deux allèles mutants; un provenant de chaque parent. En conséquence, la F1 a le phénotype d'un mutant homozygote. Alors, on peut conclure que le gène muté inconnu est le même que le contrôle positif testé.

À des fins de compréhension pour mes résultats, lorsque le croisement des deux mutations résulte en un phénotype WT, cela se nomme une complémentation. Au contraire, si le croisement résulte en un phénotype mutant, cela se nomme une non-complémentation.

Séquençage des mutants

Une fois que les mutants ont fait leurs preuves, il faut découvrir quels sont les gènes mutés en cause. Pour cela, il faut séquencer les mutants. Avec *C. elegans*, il y a plusieurs techniques disponibles. Nous avons opté pour une identification par « single-nucleotide polymorphism » (SNP) par One-Shot Whole Genome Sequencing. C'est une méthode grandement employée par les laboratoires de *C. elegans* que mon directeur de recherche avait utilisé pour identifier ses mutants résultants de ses mutagenèses antérieures.

Hybridation des mutants

Principe et déroulement

Pour pouvoir identifier les mutants par SNP-mapping, il nous faut les hybrider avec une souche polymorphique. Il s'agit de faire un croisement « relativement » simple pour chaque mutant. À la fin d'un de ces croisements, on doit réobtenir le phénotype d'hyper-accumulation d'ovocytes. Si on se fie aux lois de Mendel, les chances d'obtenir un mutant hybridé homozygote en F2 après l'un de ces croisements sont de 3/64.

Mais, il est assez rare que la génétique coopère comme prévu, surtout lorsqu'on travaille avec des génotypes aussi complexes.

Ici, on a deux gènes balancés, un gène muté inconnu et un gène qui rend la lignée germinale fluorescente. Tous ces gènes doivent ressortir homozygotes du croisement. Cela fait en sorte qu'à chaque croisement, il faut isoler entre 300 et 400 F2' et qu'un maximum d'environ dix mutants hybridés peuvent être isolés par croisement. Ensuite, on les laisse croître jusqu'à ce que leurs pétris soient pleins et on les gèle pour les conserver avant d'extraire leur ADN pour leur séquençage.

Déroulement d'un croisement d'hybridation

En génétique, lorsqu'un croisement est effectué, la génération parentale est nommée P0. Ici, la P0 est un mâle d'une souche polymorphique WT Hawaïenne et un hermaphrodite triple-mutant ayant une mutation sur un gène inconnu. Pour information, la souche WT Hawaïenne produit et maintient d'elle-même ses mâles d'une génération à l'autre [74]. Cela rend plus facile sa maintenance et les croisements avec cette souche.

Pour effectuer un de ces croisements, nous mettons cinq hermaphrodites au pharynx fluo en présence de 30 mâles pendant 24 h à 20 °C. En effet, l'abondance de mâles de la souche WT Hawaïenne rend les croisements beaucoup moins difficiles. Par la suite, on isole les hermaphrodites fécondés et les laisse pondre à 15 °C pendant deux à trois jours, selon l'état de santé du ver. La génération hétérozygote qui en découle se nomme la F1. La génération autofécondée suivante est la F2 et est censée contenir des individus homozygotes (1/4 pour chaque allèle). Vu que mes vers possèdent des gènes létaux balancés, le seul moyen de conserver le balancement est de recroiser la F1 ensemble, voir le schéma (Fig. 9). Cette F1 contient à la fois des mâles au pharynx fluo et non-fluo et des hermaphrodites avec ou sans pharynx fluo. Il faut donc recroiser la F1 dans les deux sens, c'est-à-dire un mâle au pharynx fluo avec un hermaphrodite au pharynx non-fluo et un mâle au pharynx non-fluo avec un hermaphrodite au pharynx fluo. En recroisant la F1, on obtient la F1' qui est aussitôt isolée à raison d'un ver par plaque. Donc, la génération autofécondée suivante qui est censée être homozygote est la F2'.

C'est cette F2' qui est criblée pour le phénotype d'hyper-accumulation d'ovocytes. La F2' est incubée à 25 °C à partir de l'œuf jusqu'au criblage. La F2' des candidats trouvés est « ré-isolée » individuellement sur de nouvelles plaques, afin de vérifier sur deux ou trois autres générations qu'ils conservent tous leurs phénotypes. C'est alors qu'ils deviennent des candidats valables qui seront congelés puis séquencés.

Bref, procéder à un seul de ces croisements équivaut à faire trois ou quatre croisements ordinaires. Au laboratoire, je faisais deux ou trois de ces croisements à la fois, en progressant avec mon autre projet sur MPK-1/MAPK, et chacun de ceux-ci duraient environ deux mois de la première étape à la congélation.

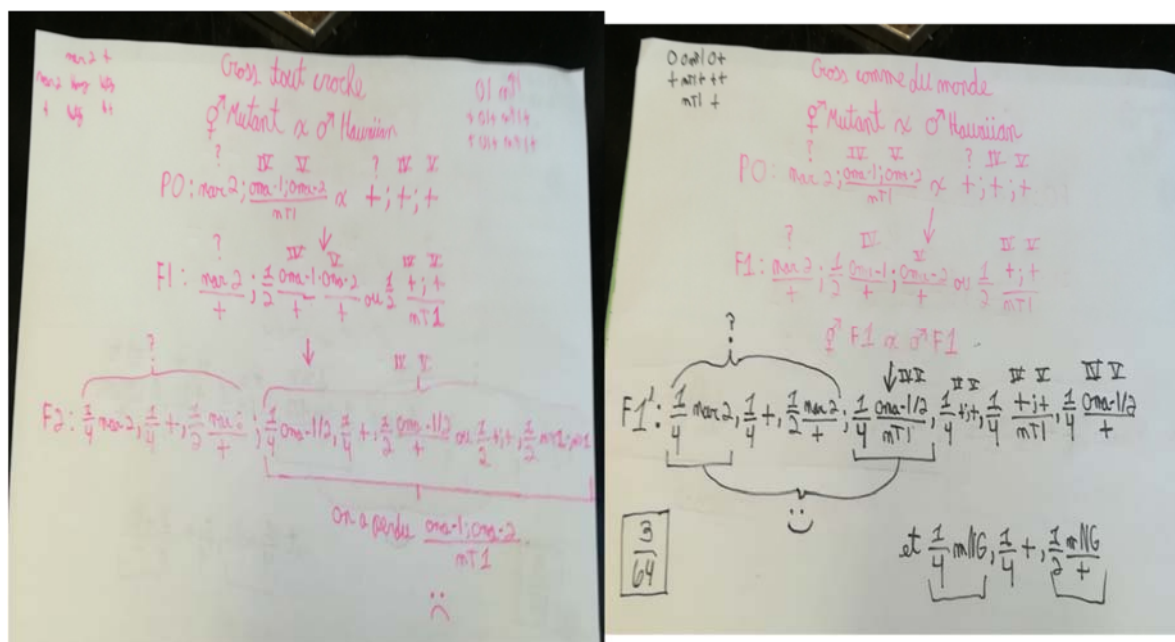


Figure 9 : Démonstration de la génétique entourant les croisements de souches ayant un balancier génétique (Dessinée à la main).

Extraction de l'ADN des mutants hybridés et SNP-mapping

Les vers sont lysés après une décongélation rapide, puis leur ADN est extrait en utilisant la méthode souhaitée. Dans un premier temps, nous avons choisi d'extraire l'ADN avec un kit commercial. Selon les contrôles de qualité, notre ADN génomique extrait n'était pas de l'ADN malgré de bonnes lectures au Nanodrop. Pour information,

le Nanodrop est un appareil servant à mesurer la concentration et la pureté d'échantillons en protéines, en ARN, en ADN ou en lipides. Donc, j'ai dû recommencer tous les croisements une deuxième fois... que de plaisir. J'ai seulement eu le temps de refaire les séries d'échantillons pour *nar3*, *nar4* et *nar5*. Le pire est que seulement quelques échantillons étaient satisfaisants, selon les contrôles-qualité de Génome-Québec. Ces échantillons sont maintenant séquencés et sont présentement en cours d'analyse dans le laboratoire.

Une fois l'ADN génomique séquencé, comment fait-on pour trouver les gènes mutés causant le phénotype d'hyper-accumulation ovocytaire? Plus haut, j'ai fait allusion à une « souche polymorphique ». Si on compare la souche WT Hawaïenne à la souche WT Bristol, l'Hawaïenne possède environ 100 000 SNPs. La souche WT Bristol est celle dont provient presque toutes nos souches dans le laboratoire. En outre, ces SNPs sont distribués uniformément dans tout le génome de *C. elegans*. Lorsqu'on croise la souche Hawaïenne avec une souche issue du WT Bristol, il se produit une recombinaison méiotique par chromosome, un évènement qui a lieu dans tous les croisements. Durant cette étape, les chromosomes se recombinent de manière impartiale. Effectivement, plus les SNPs sont près de la mutation inconnue, moins grande est la probabilité qu'un d'eux devienne lié génétiquement à la mutation après la recombinaison.

Cela fait en sorte que dans la F2 d'un croisement polymorphique, seules des séquences dites Bristol se retrouveront près de la mutation inconnue. Par conséquent, lors de l'analyse, on cherche les endroits du génome exempts de SNPs Hawaïens. Vu que chaque évènement de recombinaison est différent, cela fait en sorte que plus on a de recombinants différents, plus l'intervalle où se situe notre mutation inconnue devient petit. D'où la nécessité de faire chaque hybridation plusieurs fois.

Après les hybridations, tous les génomes des mutants hybridés sont séquencés afin de pouvoir superposer les emplacements de leurs SNPs et ainsi définir un intervalle pour la mutation inconnue. Évidemment, chaque mutant est analysé individuellement. Pour faire simple, le logiciel considère le ratio ADN Bristol Vs. ADN Hawaïen afin de nous fournir des endroits plus spécifiques pour rechercher la mutation inconnue [75].

Résultats

Caractérisation des lignées germinales des mutants

J'ai analysé les données et monté un graphique représentant le volume de fluorescence moyen de la lignée germinale de chaque souche. Bien entendu, je n'ai pas qu'analysé les mutants, j'ai aussi fait plusieurs contrôles. Parmi les contrôles, il y a la souche double-mutante pour *oma-1; oma-2* et les triples-mutants *aak-1; oma-1; oma-2*, *daf-18; oma-1; oma-2* et *strd-1; oma-1; oma-2*. Pour information, j'ai fait moi-même tous ces croisements « relativement faciles ». À noter que je n'ai pas eu le temps d'analyser la souche *strd-1; oma-1; oma-2*, car j'ai éprouvé beaucoup de difficultés à réaliser son croisement pour des raisons tout à fait inconnues. Toutes les autres souches sont présentes dans le graphique I (Fig. 11).

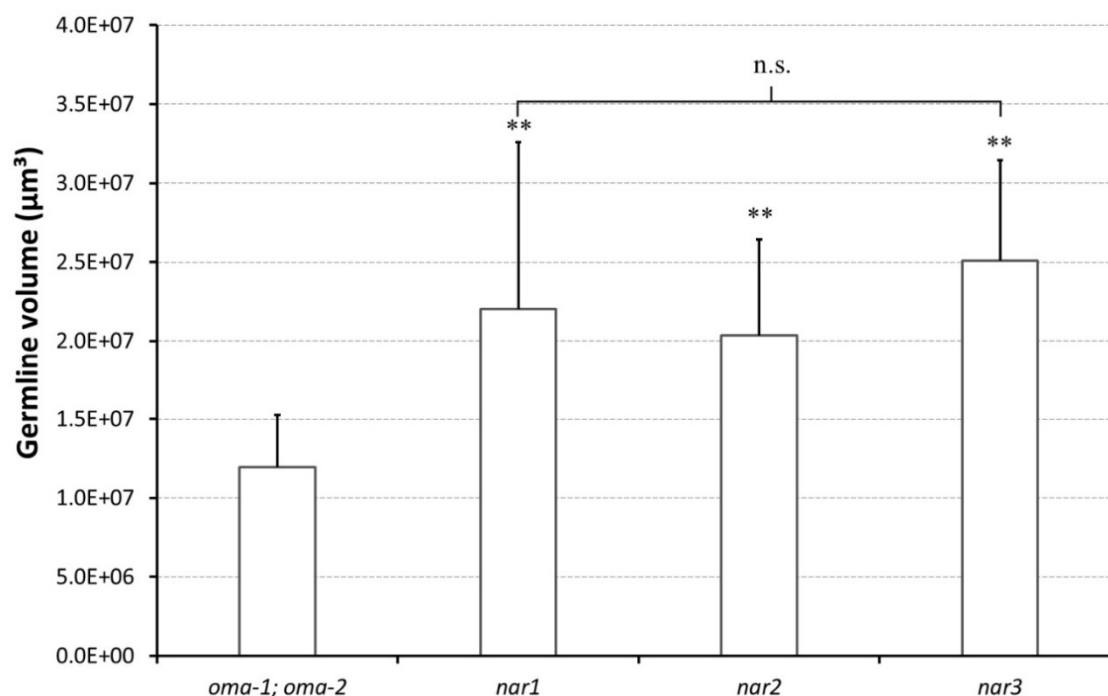


Figure 10 : Caractérisation supplémentaire des volumes des lignées germinales des mutants *nar1*, *nar2* et *nar3* incubés à 25 °C.

Parmi les mutants isolés, on remarque que seulement deux, soit *nar4* et *nar5*, sont statistiquement différents du contrôle. En effet, seulement ces deux mutants

accumulent beaucoup d'ovocytes si on les incube à 25 °C pendant 24 heures à partir de la fin du stade L4. Par contre, si on incube *nar1-3* pendant 48 heures au lieu de 24 heures, ils se mettent alors à accumuler des ovocytes de façon significative, tandis que le contrôle *oma-1; oma-2* demeure semblable (Fig. 10).

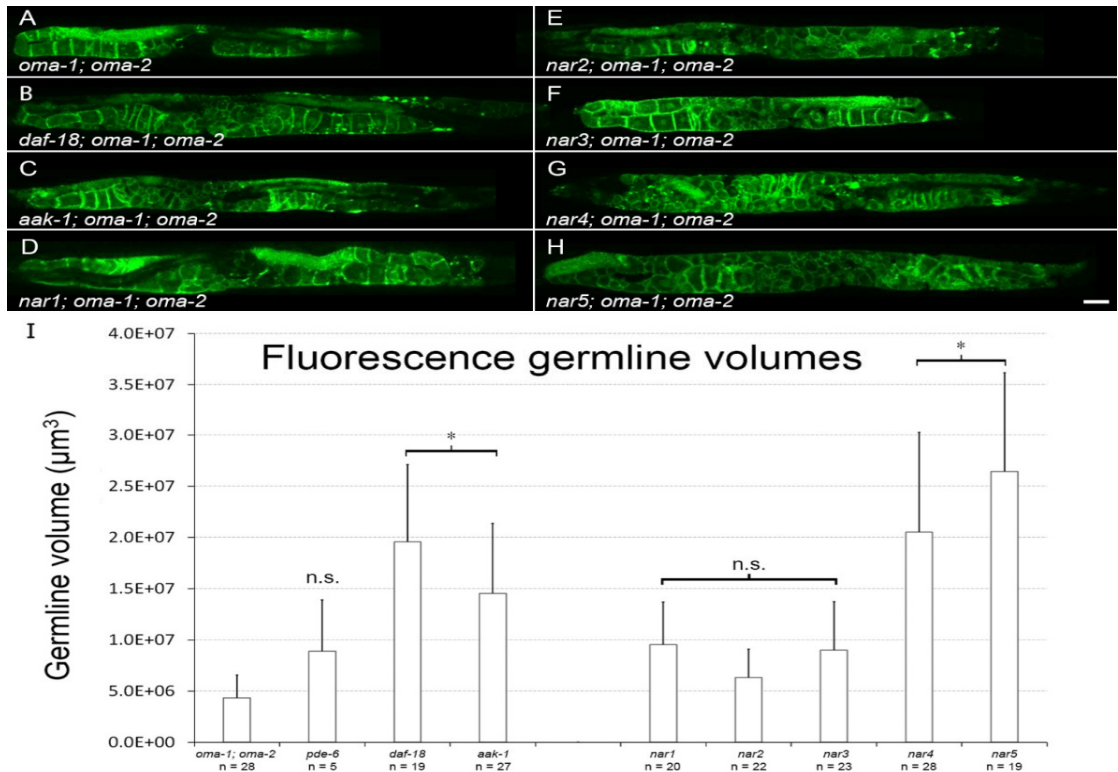


Figure 11 : Caractérisation primaire des mutants issus de la mutagenèse du projet 1.

(A) Contrôle négatif du crible et souche initiale de la mutagenèse ayant le génotype *oma-1; oma-2/nT1*. (B) Mutant *daf-18/PTEN*. (C) Mutant *aak-1/AMPK α 1*. (B,C) Ces souches sont les contrôles positifs de la mutagenèse. Elles accumulent des ovocytes. (D-H) Mutants issus de la mutagenèse possédant des gènes mutés inconnus. Comme les contrôles positifs, ces souches accumulent des ovocytes. (A-H) Toutes ces souches possèdent le balancement des gènes *oma-1; oma-2*. La gonade antérieure est à droite et la vulve en bas. Barre d'échelle à 50 μm . (I) Volume des lignées germinales des souches A-H et du mutant *pde-6/PDE8A/B* ayant un phénotype intermédiaire. *: $p \leq 0.01$, One-way ANOVA avec Tukey HSD. n.s., not significant.

Les statistiques comparent les résultats de chaque souche à ceux de la souche WT. Allèles: *pde-6(ok3410)*, *aak-1(tm1944)*, *oma-1(zu405te33)*, *daf-18(ok480)*, *oma-2(te51)*, *nar-1* à *nar-5*. n : Nombre d'échantillons.

Afin de satisfaire votre curiosité, je mentionne que si on incube les triples-mutants *aak-1/AMPK α* , *strd-1/STRAD*, *daf-18/PTEN*, *nar4* et *nar5* pour la même durée que les

mutants *nar1*, *nar2* et *nar3*, ils explosent littéralement. C'est-à-dire que leur gonade sort au complet de l'animal par la vulve. Ces mutants ne peuvent donc pas être analysés avec une incubation aussi longue à 25 °C. Pour ces raisons, la figure 6 (Fig. 10) ne montre que les mutants *nar1* à *nar3* et le contrôle. De plus, les images A à H de la figure 5 (Fig. 11) montrent le phénotype de chaque souche.

Identification des gènes mutés

Nous ne connaissons toujours pas les gènes mutés par les allèles *nar1* à *nar3*, mais nous avons quelques résultats concernant les allèles *nar4* et *nar5*. Par contre, les tests de complémentation et les croisements d'hybridés que j'ai eu le temps de mener à terme nous ont montré de curieux résultats.

Lors de ce criblage pilote, nous avons criblés 7 200 génomes haploïdes. Cela est assez loin de la saturation du génome qui se situe entre 20 000 et 30 000 génomes haploïdes criblés.

Tests de complémentation

Mutant *nar4*

Malheureusement, je n'ai eu le temps que de faire ce test avec le mutant *aak-1/AMPK α 1* (*aak-1*; *oma-1*; *oma-2*), un des contrôles positifs. Les résultats de ce test avec le mutant *nar4* démontraient une non-complémentation. Le phénotype que les vers de la F1 montraient n'était pas tout à fait celui d'*aak-1/AMPK α 1*, ni celui propre au mutant *nar4*. Donc, il est donc difficile de conclure si le gène inconnu muté dans l'allèle *nar4* est *aak-1/AMPK α 1*.

Mutant *nar5*

Par la suite, j'ai fait le test une première fois avec le mutant *nar5*. Les résultats démontraient aussi une non-complémentation, mais cette fois le phénotype des vers de la F1 ressemblait beaucoup à celui propre au mutant *nar5*. Après ces résultats curieux,

nous avons décidé de recommencer ce test pour le mutant *nar5*. Le deuxième test suggère un résultat complètement différent. Tous les vers de la F1 avaient maintenant un phénotype WT en ce qui a trait à leur production d'ovocyte. Le balancier sur les gènes *oma-1*; *oma-2* a peut-être été « perdu » dans cette F1.

Observations lors des hybridations des mutants *nar4* et *nar5*

J'ai d'abord hybridé mon meilleur mutant; *nar5*. Nous avons aperçu un curieux résultat émanant du nombre de candidats trouvés lors de cet essai, celui-ci s'avérait beaucoup plus élevé que prévu. Afin de pouvoir comparer, j'ai immédiatement hybridé mon deuxième meilleur mutant; *nar4*.

Lorsque j'ai hybridé la souche *nar4*, sur l'étendue de mes cinq essais, j'ai obtenu des essais très variés avec peu de candidats valables par essai. Je rappelle qu'un candidat valable est un ver qui produit de la progéniture balancée pour *oma-1*; *oma-2*, montre une lignée germinale verte fluo et accumule des ovocytes. En tout, on a congelé et fait séquencer 32 candidats F2 homozygotes valables pour *nar4*. En faisant quelques calculs rapides, on arrive à dire qu'environ $42/629 \pm 45/919$ candidats valables sont trouvés et congelés par essai. Sachant que j'ai criblé 516 plaques en tout, alors on devrait en trouver un tous les environ 34 ± 26 plaques.

Par contre, lorsque j'ai hybridé le mutant *nar5*, j'ai criblé 340 plaques en tout et trouvé 53 candidats F2 homozygotes, puis congelé et séquencé 38 d'entre eux après double vérification. En se fiant aux données de l'hybridation de *nar4*, nous aurions dû n'en trouver qu'environ dix. Que s'est-il passé?

Discussion

En couplant les résultats des tests de complémentation et d'hybridation de *nar5*, nous nous sommes posé des questions. Nous avons émis l'hypothèse que la mutation *nar5* était peut-être liée génétiquement à l'un des gènes *oma*. Cela pourrait partiellement expliquer les résultats non-constants obtenus lors des tests de complémentation.

Résultats préliminaires des séquençages

Jusqu'à maintenant, les analyses bioinformatiques du séquençage des mutants *nar4* et *nar5* ont donné quelques résultats intéressants. Je n'ai pas fait ces analyses, c'est Matthieu Valet qui les a faites.

Les résultats de séquençage indiquent que, en plus de plusieurs autres mutations homozygotes, le mutant *nar4* a une transition d'un nucléotide C à T dans le gène *aak-1/AMPK α_1* . Cette transition modifierait la glycine 134 en arginine. Cette mutation pourrait dénaturer une structure secondaire de l'enzyme, ce qui peut l'empêcher de fonctionner complètement ou partiellement.

En outre, les résultats de séquençage indiquent que le mutant *nar5* a aussi une transition d'un nucléotide C à T dans le gène *aak-1*. Par contre, celle-ci aurait lieu au début du septième intron et ferait en sorte que cet intron n'est pas épicé lors des événements d'épissage durant la transcription. Cette mutation doit probablement complètement empêcher le repliement de l'enzyme et l'empêcher de fonctionner. Cela fait en sorte que l'enzyme est probablement aussitôt dégradé.

Heureusement, ces résultats prouvent que le criblage pilote que nous avons tenté fonctionne. La suite de ce projet est donc de séquencer les mutants *nar1* à *nar3* et de refaire le criblage jusqu'à se rendre à la saturation du génome pour découvrir tous les acteurs du mécanisme rétroactif pour finalement pouvoir l'assembler. De mon point de vue, cette tâche s'annonce assez colossale et ardue, mais pas impossible.

Malheureusement, nous savions déjà qu'AAK-1/AMPK α_1 fait partie du mécanisme rétroactif. Il faudra donc attendre la suite du projet afin de trouver de nouvelles cibles pour éventuellement assembler le mécanisme rétroactif.

Ces résultats nous prouvent une fois de plus l'importance des mutations qu'AAK-1/AMPK α_1 peut subir, qui ultimement pourraient aussi avoir le potentiel d'initier un cancer chez l'humain. Ici, il s'agit d'une transition qui modifie la nature d'un nucléotide de la protéine et d'une transition qui empêche complètement la production de

la protéine. Donc, ces deux mutations nuisent au fonctionnement d'AAK-1/AMPK α_1 . Dans le cas où une de ces mutations aurait lieu au début de la formation d'une tumeur, alors la cellule progénitrice serait capable de surprolifération [76]. Cette tumeur pourrait ensuite, en accumulant d'autres mutations, devenir cancéreuse.

CHAPITRE III

PROJET 2 : ACTIVITÉ DE MPK-1/MAPK DANS LES CSG

Origine du projet

Sachez que ce projet n'était pas prévu dans ma maîtrise. Il est arrivé après que le laboratoire de la Dre. Iva Greenwald eu développé une nouvelle stratégie afin de pouvoir utiliser la technologie du Kinase Translocation Reporter (KTR) chez *C. elegans* [77]. Mon directeur de recherche a eu l'idée de conduire ce projet suite à ses expériences antérieures avec les mutants *mpk-1*/MAPK. Quelques années plus tôt, mon directeur de recherche a mesuré les indices mitotiques des souches WT et mutante pour *mpk-1*/MAPK.

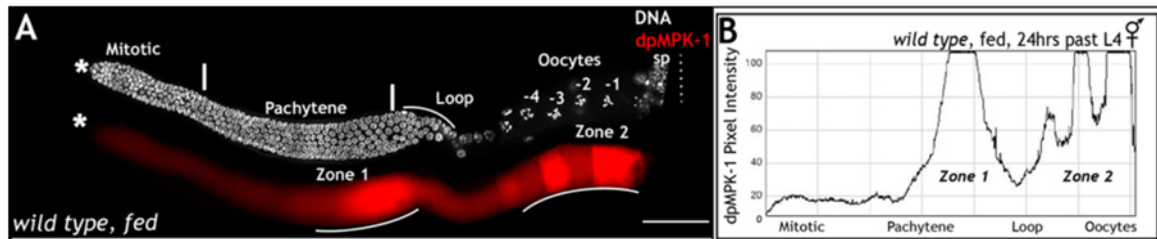


Figure 12 : Adaptée de Figure 2. *daf-2* couples nutritional cues to MPK-1 activation, in zone 1 [47].

A, C, E, G, I. Dissected adult (24 hours past L4) hermaphrodite germ lines stained for DNA (DAPI, white) and dpMPK-1 (red). A: Wild type germ lines from fed conditions exhibit two zones of MPK-1 activation and 6–7 oocytes. B, D, F, H, J. Quantitative measure of dpMPK-1 levels from A, C, E, G and I taken with Image J. X-axis depicts germ cell position along the length of the germ line, and Y-axis measures the dpMPK-1 accumulation as pixel intensity. Experiment performed 4 times; 50 germ lines analyzed each time. Scale bar: 20µm.

Pour faire bref, la souche mutante pour *mpk-1*/MAPK possède un IM germinale très faible comparé au WT. On conclut que les CSG de la souche mutante pour *mpk-1*/MAPK ne prolifèrent pas ou presque. On s'est donc demandé : pourquoi est-ce que les CSG d'un ver n'ayant plus d'activité MPK-1/MAPK ne prolifèrent pas normalement?

Dans la littérature, un anticorps reconnaissant la forme doublement phosphorylée de MPK-1/MAPK a été utilisé sur les CSG afin de déterminer la présence de MPK-1/MAPK sous forme active dans ces cellules [78] (Fig. 12). Les résultats indiquent un fort signal dans la région des ovocytes en gradient décroissant jusqu'à la moitié de la région du pachytène. Ces résultats témoignent de la présence de la forme active de MPK-1/MAPK dans ces deux régions.

Par contre, certaines publications mentionnent un faible signal au niveau des CSG. À l'œil et par analyse, on observe un très faible signal dans cette zone. À ce sujet, la littérature indique que c'est probablement un effet de « background » [78], mais nous avons émis l'hypothèse que c'est en effet un signal de l'anticorps. Simplement, il se pourrait que la limite de détection de cet anticorps soit atteinte, donc que la quantité de MPK-1/MAPK active présente serait trop faible pour être détectée avec cette technique. Pour ces raisons, nous avons décidé de vérifier cela avec un biosenseur potentiellement beaucoup plus sensible; le KTR.

Technologie du KTR

Le KTR est une construction humaine d'un peptide comportant un Nuclear Export Signal (NES), un Nuclear Localisation Signal (NLS) et un ou plusieurs site(s) de phosphorylation de la kinase souhaitée. Le nôtre utilise trois sites spécifiques à MPK-1/MAPK de LIN-1/ELK-1 (Fig. 13) [77]. De plus, la version utilisée pour ce projet est un nKTR, c'est-à-dire que sa localisation est nucléaire avant d'être phosphorylé. Une fois phosphorylé par MPK-1/MAPK, le nKTR est exclu du noyau.

Dans leur construction moléculaire, les membres du laboratoire de la Dre Greenwald l'ont couplé avec un mCherry-H2B qui est une protéine de fusion des histones 2B, donc de la chromatine (Fig. 13). Cela permet de mieux discerner les noyaux, en rouge, des cellules [77]. Le couplage de ces deux outils moléculaires se fait à l'aide d'un peptide 2A qui permet de co-exprimer des protéines sur le même transgène [79].

Malgré un outil aussi fiable que le nKTR, il reste quelques défis à surmonter. Le fait est que dans la zone niche, les cellules sont très compactes et plutôt petites, sans tenir compte du syncytium. Donc, nous avons dû adapter la méthode d'analyse utilisée par le laboratoire du Dr. Greenwald, afin que le nKTR se situe mieux aux CSG. Eux, ont calculé le ratio du signal mCherry sur le signal du GFP nucléaire pour évaluer l'activité de MPK-1/MAPK dans les cellules précurseurs de la vulve [77] (Fig. 13). Cela fonctionne bien dans ces cellules, mais dans notre cas nous avons trois types de cellules assez différentes à analyser. Dans les CSG de *C. elegans*, la taille du noyau et le stade du cycle cellulaire varient ce qui fait varier la quantité et l'emplacement de la chromatine, donc du signal mCherry. Pour pallier à cette variabilité, nous avons décidé de n'utiliser le signal mCherry que pour délimiter les noyaux des CSG. Je vous rappelle que le nKTR en absence d'activité MPK-1/MAPK se situe au noyau et qu'il devient cytoplasmique lorsqu'il est phosphorylé. Donc, le signal GFP en présence d'activité de MPK-1/MAPK est plus fort dans le cytoplasme qu'en absence d'activité. C'est pour cela que nous avons décidé d'analyser le nKTR en calculant le ratio du signal GFP dans le cytoplasme sur le signal GFP dans le noyau de chaque cellule analysée.

Si et seulement s'il n'y a pas de déphosphorylation du nKTR, alors le nKTR mesure l'accumulation graduelle d'activité MPK-1/MAPK. Par contre, si le nKTR est déphosphorylé, alors le nKTR mesure l'accumulation de la différence entre l'activité kinase de MPK-1/MAPK et l'activité phosphatase pour ces sites dans les CSG.

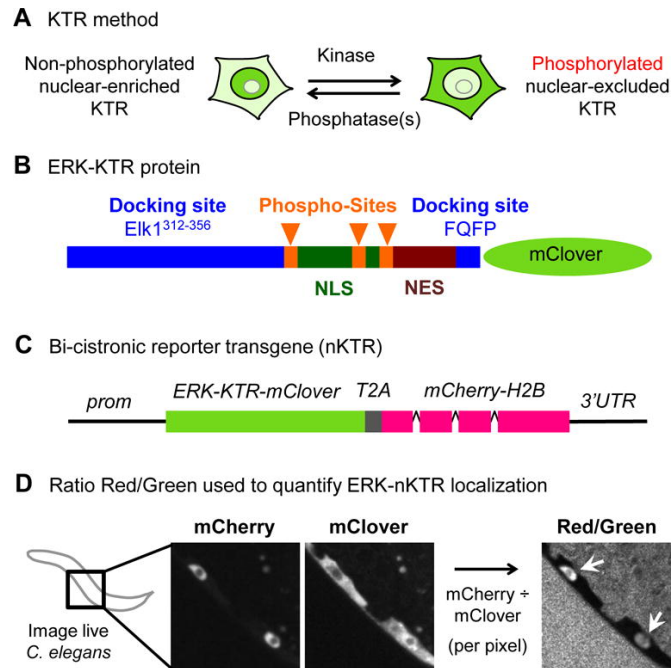


Figure 13 : Adaptée de Figure 1. The nuclear ratio ERK-nKTR design [77].

(A) The KTR method (Regot et al., 2014). When kinase activity is low, the KTR sensor protein is not phosphorylated and is nuclear-enriched. When kinase activity is high, the KTR sensor is phosphorylated and excluded from the nucleus. (The KTR is always largely excluded from the nucleolus.) (B) The ERK-KTR sensor is composed of peptides from Elk1 (Elk1312–356 and FQFP), which promote ERK docking to substrates, followed by a module containing NLS and NES sequences, S/T-P phospho-acceptor residues for phosphorylation by ERK (Phospho-Sites), and the green fluorescent protein mClover. An annotated protein sequence of ERK-nKTR-mClover is shown in Table S2. (C) Bicistronic transgene design of ERK-nKTR: the coding region for a viral 2A peptide (T2A) is inserted between the coding regions for ERK-KTR-mClover and mCherry-H2B. The T2A peptide triggers “ribosomal pausing” efficiently in *C. elegans* (Ahier and Jarriault, 2014), such that ERK-nKTR-mClover and mCherry-H2B are encoded by a single transcript but produced as two separate, functional proteins in an equimolar ratio. Tissue-specific expression of the bicistronic transcript is achieved using appropriate promoter (prom) and 3' UTR sequences. (D) After imaging of live *C. elegans*, the ratio of mCherry to mClover intensity is calculated per pixel, producing a new image (Red/Green), a pictorial representation of the the Red/Green ratio within nuclei (arrows).

Spécifications des mesures avec le nKTR

Méthode générale

Pour mesurer la moyenne de fluorescence verte dans le noyau des CSG dans toutes les zones, on doit entourer d'un ovale le noyau de la CSG en se servant de la fluorescence rouge. Ensuite, on prend une mesure en transférant la position et la forme de l'ovale entourant le noyau de la CSG sur l'image contenant le signal vert (Fig. 14).

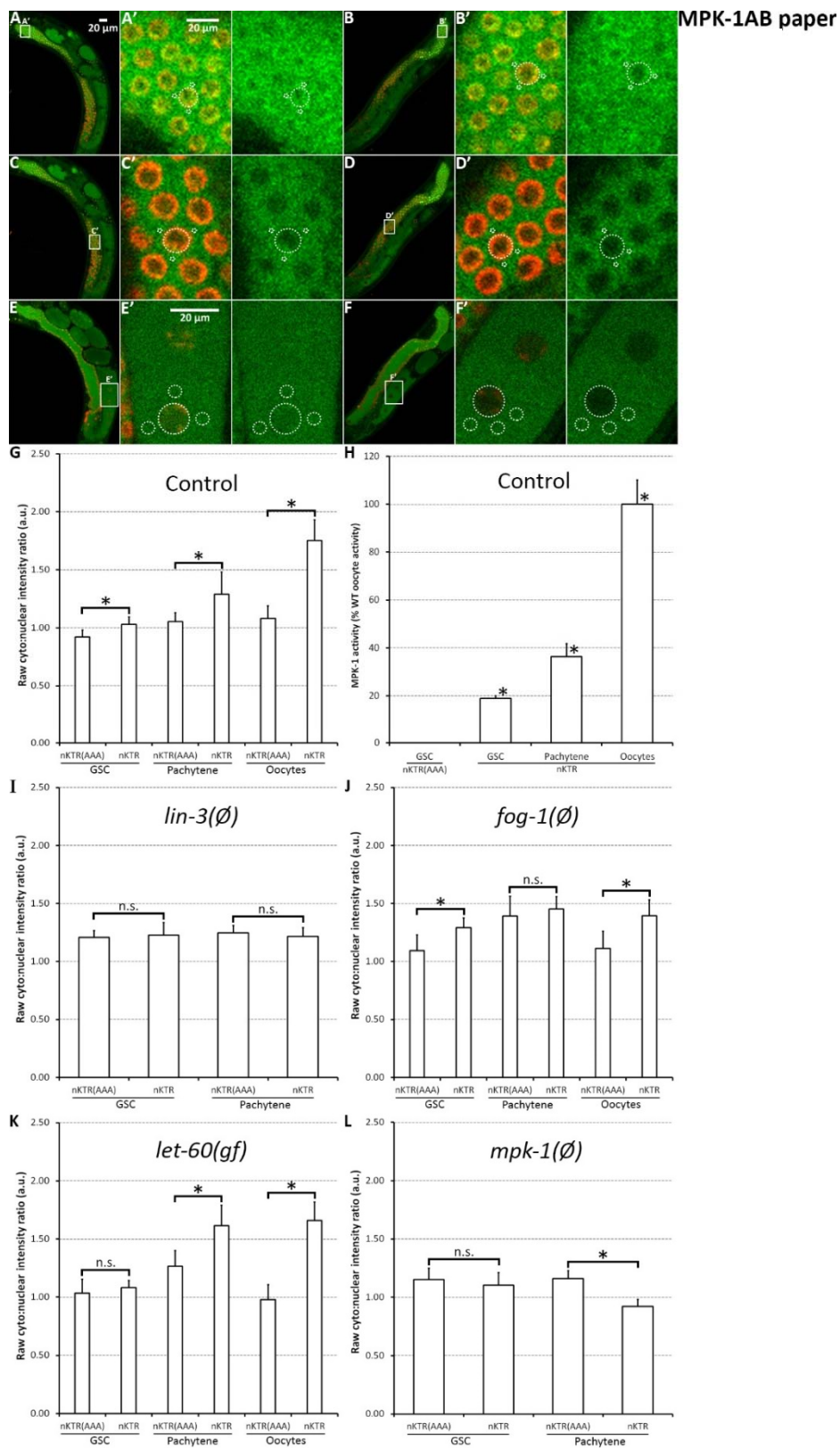


Figure 14 : Figure S1 de l'article. Voir description détaillée dans l'article.

Régions du pachytène et de la niche

Pour mesurer la moyenne de fluorescence verte dans le cytoplasme des zones du pachytène et de la niche, on a décidé de dessiner trois ovales de 0,5 μm assez près autour du noyau de la CSG en s'assurant de ne jamais prendre une mesure dans le noyau d'une autre CSG. La mesure est acquise avec une fonction dans le logiciel qui fait en sorte de combiner les images contenues dans les trois ovales dispersés dans le cytoplasme ensemble.

Région des ovocytes

Pour mesurer la même chose dans les ovocytes, le même principe est appliqué. Par contre, la taille des ovales a été définie à 4 μm , car les ovocytes sont d'énormes cellules. Nous avons ainsi obtenu une couverture de leurs cytoplasmes mieux adaptée.

Cellules analysées

Région des ovocytes

Pour la région des ovocytes, les cinq ovocytes suivant celui qui est le plus près de la spermathèque ont été choisis pour l'analyse. La raison est que le plus près a beaucoup de chance d'avoir déjà été activé par le sperme. Si c'est le cas, il a alors activé des cascades de signalisation liées au développement embryonnaire qui peuvent fausser les résultats [40].

Région du pachytène

Pour la région du pachytène, cinq cellules sont choisies. À partir du pachytène, le bras de gonade devient plus étroit, donc on devait absolument éviter les cellules qui sont sur le bord, puisque la lecture prise dans le cytoplasme pourrait se retrouver hors du bras de gonade. La première cellule choisie est toujours la plus centrée de la fin du pachytène et assez éloignée du dernier ovocyte. Ensuite, on prend quatre autres cellules

réparties tout au long du pachytène, sans entrer dans la zone de transition. Dépendamment de la souche, les CSG du pachytène peuvent être assez compactes, ce qui rend difficile la mesure de leurs cytoplasmes. Pour éviter cela, des cellules ayant un pourtour qui n'est pas trop occupé par d'autres cellules ont été choisies.

Région de la niche

Pour la région de la niche, notre région d'intérêt, les cellules sont choisies méticuleusement. Comme pour celles du pachytène, les CSG au milieu du bras de gonade sont priorisées. Il faut d'abord repérer la cellule la plus près de la cellule de l'extrémité distale du bras de gonade. Ensuite, en restant au milieu du bras de gonade, comptez les cellules pour faire des zones de cinq CS jusqu'à avoir compté quinze cellules. Cela crée les zones 1-5, 6-10 et 11-15 (Fig. 15).

D'ailleurs, j'ai trouvé un moyen dans le logiciel qui m'a permis d'annoter à la main ces zones sans altérer les images brutes. Donc, chaque cellule au centre de chaque zone est mesurée. Cela nous rend une mesure globale de l'activité de MPK-1/MAPK dans les CSG résidentes dans la niche. De plus, cette méthode nous permet d'analyser chacune des trois zones de la niche individuellement, ce qui nous permet de faire des analyses plus approfondies de notre zone d'intérêt.

Génotypes analysés

Pour confirmer que la nouvelle méthode fonctionne bien, nous avons commencé par examiner chaque région des ovocytes, du pachytène et de la niche des versions senseur et contrôle de la souche WT (Fig. 15A). Une fois satisfaits du rendement de la méthode, nous avons poursuivi avec différents mutants. Les gènes mutés que nous avons analysés sont *lin-3*, *fog-1*, *let-60gf* et *mpk-1B* (Fig. 15).

Génotype *lin-3/EGF*

lin-3 (*lin*, cell lineage abnormal) est le gène qui produit la protéine orthologue humaine de type EGF de *C. elegans* [80]. Nous avons choisi d'analyser ce mutant, car LIN-3/EGF est une protéine en amont de la voie MAPK. C'est-à-dire que c'est le ligand qui se lie au récepteur LET-23/EGFR, en amont de la voie MAPK. Donc, si ce gène est muté, alors l'activité de la voie MAPK devrait s'en retrouver grandement diminuée, voire nulle.

Le mutant *lin-3* démontre plusieurs phénotypes. Entre autres, ce mutant ne peut ovuler ses ovocytes, qui s'activent alors spontanément et deviennent endomitotiques (EMOs) [80] (Fig. 15B). Cela a pour effet de remplir la zone des ovocytes, ce qui active le mécanisme rétroactif qui inhibe la prolifération des CSG. En conséquence, toute la lignée germinale de l'animale entre en quiescence. Nous avons mesuré l'IM de ce mutant et celui-ci démontre le faible niveau de prolifération dans sa lignée germinale (Fig. 15).

Ce mutant a donc servi de contrôle négatif quant à l'activité de MPK-1/MAPK dans toute la lignée germinale, sauf la région des ovocytes puisqu'ils sont endomitotiques dans ce mutant. On s'attend à ce que ce mutant n'ait pas d'activité de MPK-1/MAPK dans ses CSG.

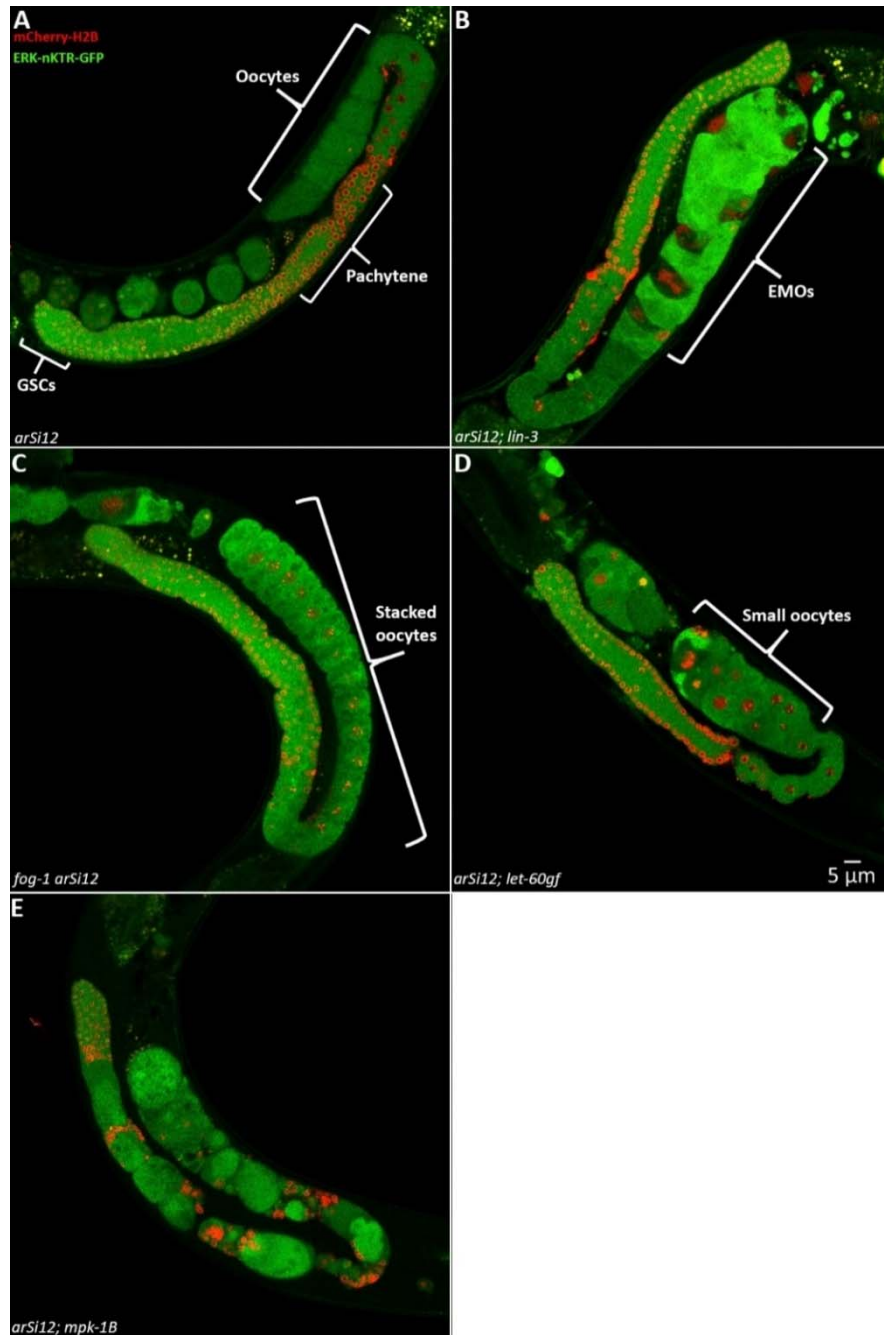


Figure 15 : Phénotypes associés aux génotypes analysés dans le projet 2.

(A) Animal WT, possédant des CSG normales. (B) Mutant *lin-3/EGF* dont les régions de la niche et du pachytène sont normales. Cette souche montre des EMOs dans sa région des ovocytes. (C) Mutant *fog-1* dont les régions de la niche et du pachytène sont normales. Cette souche montre des ovocytes très compacts. (D) Mutant *let-60gf/RASgf* dont les régions de la niche et du pachytène sont normales. Cette souche montre de petits ovocytes assez compacts. (E) Mutant *mpk-1B* dont la région de la niche est normale. Cette souche montre des CSG anormales à partir de la zone du pachytène, ainsi que des gamètes aberrants (A,B,C,D,E)
 Allèles : WT, *arsi12*, *lin-3(n1058)*, *fog-1(q785)*, *let-60(ga89)gf*, *mpk-1B(qIs56)*.
 Barre d'échelle de 5 µm.

Génotype *fog-1*

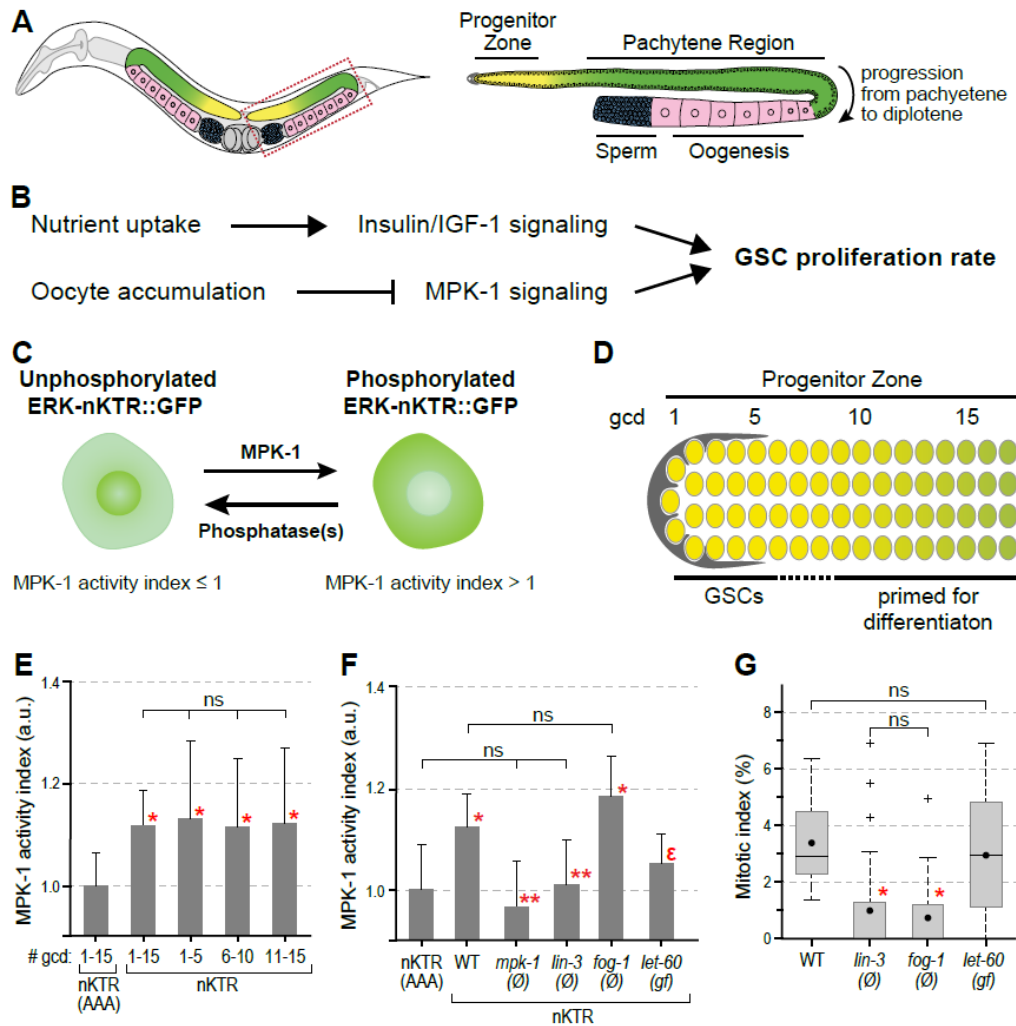


Figure 16 : Figure 1 de l'article. GSC MPK-1 activity does not correspond with GSC proliferation. Voir description détaillée dans l'article.

La mutation *fog-1* cause une « Feminisation of Germline » car ce gène est requis pour la formation du sperme chez *C. elegans* [59]. Chez l'humain, ce gène code pour une protéine « Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding (CPEB) » [59]. Un mutant *fog-1* est donc un ver qui ne produit pas de sperme. Cela a pour effet d'empêcher l'activation des ovocytes, ce qui entraîne leur accumulation (Fig. 15C). Une fois assez d'ovocytes accumulés, le mécanisme rétroactif s'active et inhibe la prolifération des CS de l'animal.

Comme preuve, son IM au stade adulte est semblable à celui du mutant *lin-3/EGF*, c'est-à-dire très faible (Fig. 16). En effet, c'est un génotype assez semblable à *lin-3/EGF*, sans que *fog-1* soit directement lié à la voie MAPK.

Ce mutant nous renseignera sur l'impact de l'activation du mécanisme rétroactif sur l'activité de MPK-1/MAPK dans les CSG. Pour ce mutant, notre hypothèse est qu'il n'y aura pas d'activité de MPK-1/MAPK dans ses CSG de la zone niche, ni dans les zones du pachytène et des ovocytes.

Génotype *let-60gf/RASgf*

let-60/RAS qui se traduit en « Lethal » signifie que lorsque ce gène est muté chez *C. elegans*, alors le ver meurt avant de se reproduire, ici au stade L1. Dans cette étude, nous avons utilisé la souche mutante *let-60gf* qui est le gain de fonction du gène de l'orthologue *C. elegans* de RAS [81]. RAS est la GTPase située en amont de la voie MAPK qui se lie aux RCPG activés par LIN-3/EGF et qui devient RAF une fois activée. LIN-45/RAF ou MAPKKK va ensuite phosphoryler MEK-2/MEK ou MAPKK qui elle va phosphoryler MPK-1/ERK ou MAPK qui activera ses cibles dans le cytosol et l'intérieur du noyau [82] (Fig. 6). En théorie, une mutation *let-60gf* suractive toute la voie MAPK et, comme de raison, MPK-1/MAPK également.

Effectivement, cette souche possède aussi ses propres phénotypes. Elle présente des ovocytes plus petits et en plus grande quantité, mais sans toutefois activer le mécanisme rétroactif (Fig. 15D).

Par ailleurs, l'allèle *let-60(gf)* est sensible à la température. C'est-à-dire que cette souche est superficiellement WT à 15 °C, mais produit une progéniture totale amoindrie lorsqu'incubée à 20 °C et est pratiquement stérile lorsqu'incubée à 25 °C. De plus, à 25 °C certains des animaux présentent un phénotype multi-vulve. De ce fait, ces vers doivent être préparés un peu différemment des autres souches. Au lieu d'être incubés directement à 25 °C à partir du stade larvaire L1, ils sont incubés à 15 °C jusqu'au milieu du stade larvaire L4 où la température d'incubation est changée à 25 °C. Cela évite que la souche

devienne stérile et inutilisable. En outre, comme l'indique son IM, les CSG de cette souche prolifèrent normalement comme dans une souche WT à 15 °C (Fig. 16). Dans ce mutant, on pense qu'il y aura une activité voire une suractivation de MPK-1/MAPK dans toute sa lignée germinale.

Génotype *mpk-1B*

mpk-1B est le gène qui produit l'isoforme B de MPK-1/MAPK. Ce gène possède deux isoformes soit le A et le B. L'isoforme A est court, tandis que l'isoforme B est long (Fig. 17A).

D'abord, un ver ayant un génotype homozygote mutant pour *mpk-1/MAPK*, donc mutant pour les deux isoformes, présente de sérieux problèmes. Il est viable, mais plusieurs de ses organes (Vulve, cellule excrétoire, spicules, etc.) présentent des défauts de croissance et il est stérile dû à un problème ayant lieu dans la méiose de sa lignée germinale [84]. Comme mentionné plus haut, les vers de cette souche ont un IM faible, ce qui témoigne d'une réduction de la prolifération de leur lignée germinale.

Pour ce qui est des phénotypes du mutant *mpk-1B*, il n'accomplit pas la méiose de sa lignée germinale adéquatement et ne produit pas d'ovocytes. Par contre, ce mutant a une vulve tout à fait normale. D'ailleurs, ces observations suggèrent que l'isoforme B de *mpk-1/MAPK* est requis dans la lignée germinale pour réaliser la méiose.

Justement, dans cet article, il est discuté des rôles distinctifs des isoformes A et B de *mpk-1/MAPK* concernant la prolifération des CS et la formation de la vulve chez *C. elegans*. Les résultats obtenus avec le nKTR liés à ce génotype ne font pas encore partie d'une publication, mais sont présentés à la figure 18.

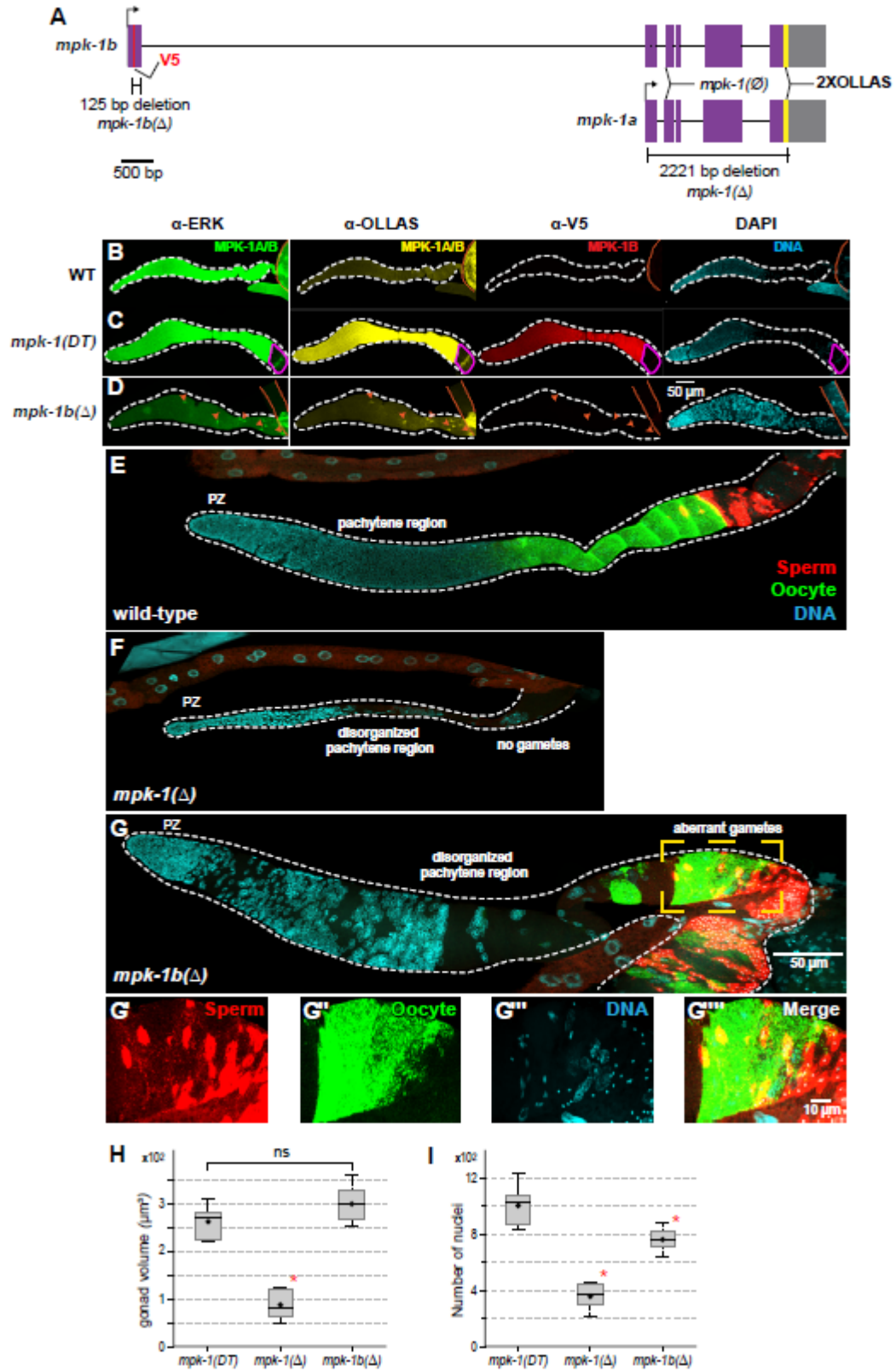


Figure 17 : Figure 2 de l'article. MPK-1B is germline-specific and promotes germline differentiation. Voir description détaillée dans l'article.

Précisions concernant les croisements des souches

Tel qu'évoqué plus haut, les différentes souches de tous ces génotypes ont été croisés avec les versions contrôle et senseur pour du nKTR, soit ERK-nKTR(AAA) et ERK-nKTR, respectivement. Pour ce faire, nous nous sommes assuré que toutes les souches étudiées, soit contrôle ou senseur, étaient homozygotes pour leurs gènes mutés spécifiques, incluant le ERK-nKTR et ERK-nKTR(AAA), après les croisements.

Puisque ce projet était complètement nouveau, je n'ai pas croisé les premières souches. Mon directeur de recherche a produit les souches *lin-3; ERK-nKTR*, *lin-3; ERK-nKTR(AAA)*, *let-60gf; ERK-nKTR*, *let-60gf; ERK-nKTR(AAA)* et *fog-1; ERK-nKTR*. J'ai généré les souches *fog-1; ERK-nKTR(AAA)*, *mpk-1B; ERK-nKTR* et *mpk-1B; ERK-nKTR(AAA)*.

Par contre, pour toutes les souches j'ai sélectionné les F2 homozygotes pour ERK-nKTR(AAA) et ERK-nKTR à la fin des croisements. J'ai eu l'aide de Pier-Olivier Martel pour le criblage du ERK-nKTR de la souche *mpk-1B; ERK-nKTR* à cause d'un manque de temps, mais je l'ai quand même personnellement vérifiée. D'ailleurs, c'est aussi lui qui a pris les acquisitions de cette souche. Pour ma part, j'ai fait toutes les autres acquisitions, ainsi que l'analyse de toutes les souches.

Acquisitions d'images des *C. elegans*

Préparation des nématodes

Dans ma partie de l'article, tous les vers ont été préparés selon le protocole suivant tel que décrit dans l'article en annexe [84]. La souche croît à 15 °C et est nourrie à l'OP50. Une fois quelques pétris pleins, les vers sont synchronisés par la méthode du « bleach » [37]. Après le bleach, les vers L1 sont incubés à 25 °C jusqu'à 24 h après le stade de vieux L4. Ensuite, ils sont transférés sur un « coverslip » et paralysés dans 8 µL de tétramisole 4,15 nM (0,10 %) dans du M9. Le M9 est un tampon qui respecte mieux l'osmolarité de *C. elegans* que l'eau. Ensuite, le « coverslip » est appliqué sur la lame puis scellé avec du VaLaP (1:1:1 Vaseline, lanoline, paraffine).

Synchronisation de *C. elegans*

Les vers croissent à 15 °C jusqu'à remplir quelques pétris, idéalement des plaques pleines d'adultes remplis d'œufs. Ensuite, les vers sont rincés de la plaque et versés dans un tube Falcon de 15 mL avec de l'eau Milli-Q (MQ) stérile. Par la suite, ils sont centrifugés à 2 500 RPM pour qu'ils forment un joli culot assez solide au fond du tube. Après, le surnageant est vidé, puis les vers sont rincés avec du M9. Après, on centrifuge le tube contenant les vers et vide son contenu. Puis, 1 mL de solution de bleach, qui consiste en un mélange d'eau, d'hydroxyde de sodium et d'eau de Javel, est ajouté. Ensuite, on vortex les vers pendant très précisément cinq minutes, puis on les centrifuge à nouveau. On poursuit en vidant le contenu, en rinçant et en centrifugeant avec de l'eau MQ stérile. Cette étape est répétée trois fois. Après, on y pipette 1 mL de M9 et on resuspend les vers en pichenettant vigoureusement le bas du tube. Par la suite, on s'assure qu'il y a bel et bien plein d'œufs en suspension, sans trop de carcasses, dans la solution de M9. Ensuite, on met le tube sur plaque agitatrice pour 48 heures à 15 °C. C'est après ce temps d'incubation que les vers, synchronisés au stade L1, sont pipetés sur des pétris stériles, puis incubés comme désiré. Pendant l'incubation sur les pétris avant d'être soumis au protocole désiré, le stade d'âge des vers est évité à tout prix.

Le principe est tel que *C. elegans* possède une cuticule et que ses œufs possèdent une coquille. Ceux-ci sont suffisamment robustes pour protéger les œufs à l'intérieur des adultes. Ces adultes, à l'exception de la cuticule et de leurs œufs, sont dissouts par la solution de bleach. Par contre, un temps de vortex trop long ferait dissoudre les œufs aussi. Cette technique quoique très puissante m'a pris beaucoup d'efforts et d'essais afin d'être maîtrisée. Seulement à la fin de ma maîtrise, je ne les ratais plus. D'ailleurs, pouvoir synchroniser des centaines de progénitures au stade L1 en même temps est un des nombreux avantages qu'offre *C. elegans* en tant qu'organisme modèle [37].

Paramètres d'acquisition

Les images ont toutes été acquises avec un microscope confocal TCS SP8 de Leica en utilisant un objectif à l'huile HC PL APO CS2 40x/1.30 NA. Avec 0,8 µm d'entre-

les coupes, les vers ont été acquis au complet à l'aide de « Z-stack » avec un scan bidirectionnel à 400 Hz en mode séquentiel. Le mode séquentiel est utilisé pour éviter d'exciter le fluorochrome rouge avec l'émission du fluorochrome vert et aussi pour éviter de brûler les capteurs. Le nKTR-GFP a été acquis en l'excitant avec un laser à 488 nm à 10 % d'intensité, pour toutes les souches, sauf le mutant *fog-1* qui était à 15 % d'intensité, avec un capteur PMT à 673 V de gain et à $559,5 \pm 21,5$ nm. L'intensité du nKTR-GFP était moins forte dans la souche mutante pour *fog-1* pour des raisons inconnues, mais puisque ce n'est pas l'intensité absolue de fluorescence qui est prise en compte dans l'analyse, mais plutôt le ratio d'intensité entre le noyau et le cytoplasme, cela n'a pas d'impact sur les résultats. Le mCherry-H2B a été acquis en l'excitant avec un laser à 552 nm à 5 % d'intensité avec un capteur HyD à 50 % de gain et à 610 ± 21 nm pour toutes les souches analysées. La distance entre les « coupes » était de $0,80 \mu\text{m}$.

Inconvénients de la méthode d'analyse avec le nKTR

Malheureusement, les mesures dans chaque cellule ne se font que sur une coupe et non sur le « stack » contenant toute la cellule. Nous ne possédions pas les ressources pour créer un logiciel d'analyse plus précis, exact et moins variable, donc nous avons choisi cette option. Je sais que certains laboratoires travaillent en ce moment pour automatiser la prise de mesures avec la technologie du KTR dans les cellules de *C. elegans*.

En outre, malgré que *C. elegans* possède deux bras de gonade, nous ne pouvions qu'analyser le bras de gonade antérieur, car l'autre se retrouvait souvent sous le tube intestinal de l'animal. D'ailleurs, il est toujours mieux d'analyser le même bras de gonade, et non de mixer les deux, lorsqu'on travaille avec la lignée germinale de *C. elegans*. En effet, une hypothèse possiblement nuisible à la reproductibilité de nos expériences est que l'apport nutritif des deux bras de gonade n'est pas le même, puisque le début de l'intestin absorbe potentiellement plus de nutriments que sa fin.

Traitement des données, statistiques et graphiques

Le traitement des données s'est fait par tests statistiques. À partir des données, les mêmes manipulations et tests ont été effectués pour chaque région du bras de gonade antérieur. On obtient un ratio de fluorescence verte pour chaque cellule et on a cinq cellules par région. Il faut alors faire la moyenne des ratios des cinq cellules de la même région du même animal pour obtenir un ratio moyen de cette région. Pour chaque région, la moyenne des ratios moyens de plus de dix souches est calculée. Ainsi, on obtient la donnée qui figure dans le graphique pour cette souche dans cette région. Les statistiques ont été calculées par ANOVA Tukey HSD.

En plus, chaque souche possède une version contrôle (ERK-nKTR(AAA)), celle dont le nKTR n'est pas phosphorylable, et une version senseur (ERK-nKTR). La version contrôle nous renseigne sur l'endroit initial et l'expression du KTR dans la souche mutante analysée. Par exemple, certains mutants expriment plus de KTR que d'autres souches. Ainsi, la souche contrôle nous permet de normaliser à 1.00 u.a. toutes les données des souches contrôles de toutes les régions pour pallier au fait que différentes souches sont analysées. Également, cela nous permet de comparer les résultats des différents génotypes entre eux.

Résultats

Région des ovocytes

D'abord, la région qui a servi de contrôle pour la technologie du nKTR dans les CS, les ovocytes. Sur le graphique D de la Figure 18, on remarque que le WT démontre une présence d'activité de MPK-1/MAPK d'une amplitude d'environ 0.6 u.a. Comme prévu, le mutant *fog-1* démontre une absence d'activité de MPK-1/MAPK dans ses ovocytes, ce qui corrèle avec son IM.

Quant au mutant *let-60gf/RASgf*, il démontre une présence d'activité de MPK-1/MAPK dans cette zone. Même qu'à environ 0.7 u.a. de différence avec le WT senseur, c'est la souche qui possède la plus grande activité dans cette zone. Ces résultats

confirment la pertinence d'utiliser le nKTR pour mesurer l'activité de MPK-1/MAPK dans les CS de *C. elegans*. Ces résultats confirment la présence d'activité MPK-1/MAPK dans la zone des ovocytes tel que décrit dans la littérature.

Région du pachytène

Poursuivons avec la région du pachytène. Sur le graphique C de la figure 18, on remarque plus ou moins le même patron que celui de la région des ovocytes. Le WT montre une présence d'activité de MPK-1/MAPK dans ses CS du pachytène d'environ 0.2 u.a., une baisse de 0.4 u.a. comparée à la région des ovocytes. Les mutants *lin-3/EGF*, *fog-1* et *mpk-1b* démontrent une absence d'activité de MPK-1/MAPK dans leur CS du pachytène, tel que prévue [84].

Pour cette région, le mutant *let-60gf/RASgf* se comporte aussi tel un WT. Même que sa baisse d'activité de la région des ovocytes au pachytène est la même que le WT. Ces résultats confirment la présence d'activité de MPK-1/MAPK dans la zone du pachytène tel que décrit dans la littérature.

Région de la niche

Nous avons d'abord mesuré l'activité de MPK-1/MAPK des CSG dans le WT. Le graphique A de la figure 18 démontre une présence d'activité de MPK-1/MAPK dans les CSG du WT. Celle-ci est de l'ordre de 0.1 u.a., mais est tout de même significative. De plus, nous avons approfondi l'étude des CSG du WT. Le graphique A de la figure 18 montre l'activité de MPK-1/MAPK de chaque région à l'intérieur de la niche. En comparant les CS de chaque région entre elles, on remarque qu'il n'y a pas de différence dans leur activité de MPK-1/MAPK. Bref, peu importe sa position dans la niche, d'une CSG à une autre l'activité de MPK-1/MAPK reste la même.

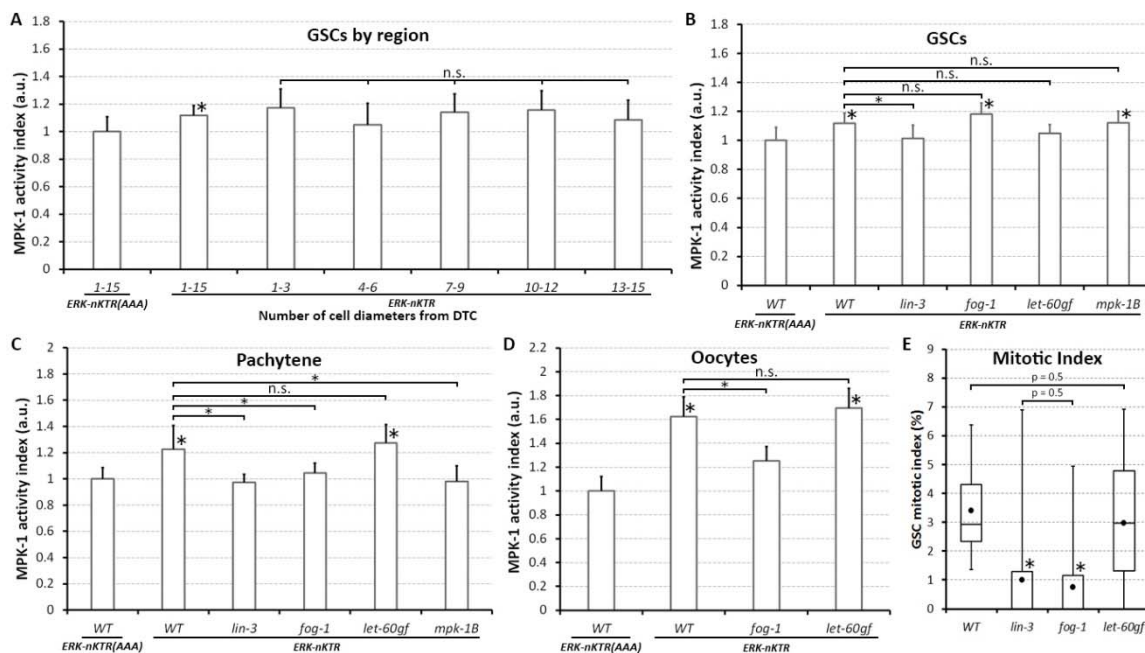


Figure 18 : Figure 1 et S1 du papier avec les résultats pour le mutant *mpk-1b*.

Sur le graphique A, les CSG sont groupées par cinq CS. C'était la méthode initiale.

Sur la figure 18B, on remarque que le mutant *lin-3/EGF* ne présente pas d'activité de MPK-1/MAPK dans ses CSG. Le mutant *fog-1* démontre une légère, mais significative activité de MPK-1/MAPK d'environ 0.06 u.a. dans ses CSG, ce qui est plus élevé que le WT lui-même. Le mutant *let-60gf/RASgf*, comme le mutant *lin-3/EGF*, ne démontre pas d'activité de MPK-1/MAPK dans ses CSG. Avec une différence d'environ 0.002 u.a. avec le WT, le mutant *mpk-1b* présente une activité de MPK-1/MAPK dans ses CSG.

Discussion

Ces résultats ne correspondent pas aux résultats attendus. En effet, nos hypothèses étaient que le mutant *fog-1* n'aurait pas d'activité de MPK-1/MAPK dans ses CSG et que le mutant *let-60gf/RASgf* en aurait au minimum autant que la souche WT.

Suivant ces résultats, nous nous sommes demandé si l'activité de MPK-1/MAPK dans les CSG était impliquée dans leur prolifération (Fig. 19). Puisque dans la souche WT, la prolifération des CSG est normale et qu'elle démontre une présence d'activité de

MPK-1/MAPK, alors il est possible que MPK-1/MAPK stimule la prolifération des CSG de façon autonome. Cette hypothèse est renforcie par le fait que dans la souche mutante *lin-3/EGF*, il y a absence d'activité de MPK-1/MAPK dans ses CSG. Je rappelle que dans cette souche, le mécanisme rétroactif est actif et ses CSG ne prolifèrent pas. Ensuite, il y a le mutant *fog-1* dans lequel les CSG ne prolifèrent pas, mais qui démontre une présence d'activité de MPK-1/MAPK dans ses CSG. Ce résultat n'élimine pas la possibilité que l'activité cellule autonome de MPK-1/MAPK dans les CSG puisse stimuler leur prolifération, mais indique qu'il n'est pas nécessaire d'inhiber MPK-1 dans les CSG pour réduire leur prolifération.

Finalement, le mutant *let-60gf/RASgf* qui a des CSG qui prolifèrent ne présente pas d'activité de MPK-1/MAPK dans ses CSG. Cette souche indique clairement que les CSG n'ont pas besoin d'activité de MPK-1/MAPK de manière cellule autonome pour proliférer. Pendant que j'écrivais mon mémoire, plusieurs expériences ont eu lieu dans notre laboratoire et les résultats démontrent que l'activité de MPK-1/MAPK promeut la prolifération des CSG de façon cellule non-autonome, depuis les tissus de l'intestin et de la gonade somatique (Chapitre IV et Annexe). Dans ce cas, pourquoi y a-t-il une activité de MPK-1/MAPK dans les CSG du mutant *fog-1* et aucune dans le mutant *lin-3*? On croit qu'un peu d'activité de MPK-1/MAPK cellule non-autonome est requise pour préparer les cellules à se différencier et que ce mécanisme serait dépendant du ligand LIN-3/EGF.

Comment cette activité est-elle cellule non-autonome? Il peut y avoir plusieurs raisons. D'abord, il faut se dire qu'avant que la lignée germinale produise des gamètes, les CSG ont déjà crû tout au long des stades larvaires, donc elles avaient probablement déjà des MPK-1/MAPK actives durant ces stades. Cela expliquerait l'activité présente dans les mutants *fog-1*. De plus, cette « activation » serait *lin-3/EGF* dépendante. Par contre, on ne détecte pas d'activité de MPK-1/MAPK dans les mutants *let-60gf/RASgf*. Notre théorie en rapport à ce génotype est que les CSG de ce mutant compensent la suractivation de sa voie MAPK par une réduction de l'activité d'une ou plusieurs autre(s) voie(s). Ces autres voies pourraient être celles qui permettent l'activité de MPK-1/MAPK dans les CSG dans les autres mutants.

Souches	Indice mitotique	Indice MPK-1	Cellule autonome?
WT	↑	↑	✓
<i>lin-3/EGF</i>	↓	↓	✓
<i>fog-1</i>	↓	↑	?
<i>let-60gf/RASgf</i>	↑	↓	✗

Figure 19 : Tableau résumé des résultats obtenus avec le nKTR.

CHAPITRE IV

PUBLICATION

Résumé des analyses dans l'article en annexe

Le chapitre qui suit présente une analyse des rôles d'ERK au sein de *C. elegans*. À l'aide d'anticorps, nous avons vérifié si les protéines MPK-1/MAPK, MPK-1A et MPK-1B sont présentes dans la lignée germinale de *C. elegans*. Ensuite, par études génétiques et analyses de phénotypes, nous avons vérifié le rôle de l'isoforme MPK-1B dans la lignée germinale de *C. elegans*. À l'aide de multiples transgènes, nous avons fait la même chose pour l'isoforme MPK-1A dans le soma. Plus spécifiquement, nous avons vérifié où l'isoforme MPK-1A est requis pour restaurer la prolifération des CSG et la formation de la vulve. De plus, nous avons analysé deux comportements anormaux chez les mutants *mpk-1*. Finalement, nous présentons un modèle résumant toutes nos découvertes concernant les isoformes de MPK-1/MAPK dans notre article.

Résultats de l'article en annexe

Ce qu'on doit retenir des figures 16 et 19, c'est qu'il y a une activité de MPK-1/MAPK qui est faible mais significative dans les CSG de *C. elegans*. Par contre, elle ne corrèle pas avec leur prolifération, donc n'en est pas responsable.

L'isoforme MPK-1B est spécifique à la lignée germinale et promeut la différenciation des CSG, mais pas leur prolifération

Ensuite, d'autres membres de l'unité de recherche, en collaboration avec la Dre Judith Kimble (University of Wisconsin-Madison), ont analysé la présence des isoformes MPK-1A et MPK-1B dans la lignée germinale. Pour ce faire, quatre anticorps ont été utilisés : l' α -ERK qui détecte MPK-1/MAPK total, l' α -OLLAS qui détecte

l'étiquette 2xOLLAS située dans la portion C-terminale de MPK-1/MAPK, l' α -V5 qui détecte l'étiquette V5 située dans l'exon spécifique à *mpk-1B* et du DAPI qui montre les noyaux des CS. Les analyses avec ces anticorps ont eu lieu dans trois souches : WT, *mpk-1(DT)* et le mutant *mpk-1B*. La souche *mpk-1(DT)* est la souche possédant les deux étiquettes V5 et 2xOLLAS et la souche mutante *mpk-1B* exprime seulement la protéine MPK-1A.

Comme prévu et en tant que contrôle négatif, la souche WT démontre une présence de MPK-1A/B avec l' α -ERK, un léger effet de bruit de fond avec l' α -OLLAS et aucune détection de MPK-1B avec l' α -V5 (Fig. 17B). La souche *mpk-1(DT)* démontre une présence MPK-1A/B avec l' α -ERK et l' α -OLLAS et une présence de MPK-1B avec l' α -V5 (Fig. 17C). Dans la souche mutante *mpk-1B*, l' α -ERK détecte MPK-1A/B, mais beaucoup moins puissamment que dans la souche *mpk-1(DT)*. L' α -OLLAS a aussi un faible signal comparé à son signal émis dans la souche *mpk-1(DT)*. L' α -V5 ne démontre aucun signal dans le mutant *mpk-1B*.

Afin de vérifier la fertilité des vers, nous avons utilisé trois techniques. La première méthode a été de quantifier les embryons pondus par les mutants *mpk-1(DT)*, *mpk-1*, *mpk-1B* et le WT à 15 °C, 20 °C et 25 °C (Fig. S3 H en annexe). En même temps, nous en avons profité pour vérifier la présence ou non de leur vulve. Comme prévu, le WT et le mutant *mpk-1(DT)* avaient tous les deux une vulve et ont démontré 99-100 % de fertilité à toutes les températures d'incubation. Quant à eux, les mutants *mpk-1* et *mpk-1B* n'ont pas pondu un seul œuf durant ces tests à toutes les températures d'incubation. En effet, ils avaient tous deux 0 % de fertilité, mais seul le mutant *mpk-1* avait une absence de vulve.

La seconde méthode a été de quantifier par IF les ovocytes et le sperme des mutants *mpk-1*, *mpk-1B* et du WT (Fig. 17E-G). Les anticorps utilisés ont été l' α -sp56 pour identifier le sperme, l' α -RME-2 pour identifier les ovocytes et du DAPI pour identifier les noyaux des gamètes. Le WT présentait du sperme et des ovocytes normaux,

le mutant *mpk-1* n'avait tout simplement pas de gamètes et le mutant *mpk-1B* a démontré des gamètes aberrants.

La troisième méthode a été de quantifier le volume des gonades et la quantité de gamètes présentent dans les souches mutantes *mpk-1(DT)*, *mpk-1* et *mpk-1B* (Fig. 17H-I). Ici, la souche mutante *mpk-1(DT)* a servi de WT. D'ailleurs, le volume des gonades a été mesuré à l'aide du logiciel Imaris. Donc, pour leur volume de gonade, les souches mutantes *mpk-1(DT)* et *mpk-1B* ont démontré les mêmes résultats, tandis que la souche mutante *mpk-1* a démontré un beaucoup plus petit volume de gonade. Quant aux gamètes, la quantité de gamètes du mutant *mpk-1(DT)* était légèrement supérieure à celle du mutant *mpk-1B* et plus de deux fois supérieure à celle du mutant *mpk-1*.

L'isoforme MPK-1B ne promeut pas la prolifération des CSG

Puis, nous avons voulu vérifier le rôle que joue l'isoforme *mpk-1B* dans la lignée germinale. Nous y avons comparé le mutant *mpk-1* et ce même mutant dans lequel un transgène, qui récupère la fonction du gène de *mpk-1B* dans la lignée germinale étiqueté avec une GFP, a été inséré (Fig. 20B-D). De plus, nous avons mesuré les IM et la quantité de CS dans la zone de transition des souches mutantes *mpk-1*, *mpk-1; germline::MPK-1B*, *mpk-1B* et WT. (Fig. 20E-F).

La figure 20A montre un ver WT qui possède une vulve et une lignée germinale tout à fait normale. La figure 20B montre un mutant *mpk-1* qui n'a pas de vulve ni de lignée germinale. La figure 20C montre un jeune adulte mutant *mpk-1* dans lequel le gène *mpk-1B* a été récupéré spécifiquement dans la lignée germinale. On y remarque une lignée germinale semblable à celle d'un WT. Par contre, du fait que ce mutant n'a pas de vulve et en le laissant croître un peu plus, ses embryons éclosent à l'intérieur de lui. Cela lui confère un phénotype de « bag of worms » (Fig. 20D).

La figure 20E montre que les IM de la souche WT et de la souche mutante *mpk-1B* sont semblables. De plus, les IM des mutants *mpk-1* et *mpk-1; germline::MPK-1B*, *mpk-1B* sont tous deux semblable et presque nul. D'ailleurs, la figure 20F du papier

montre que les résultats pour la quantité de CS en zone de transition corrélient avec les résultats d'IM de chaque souche testée.

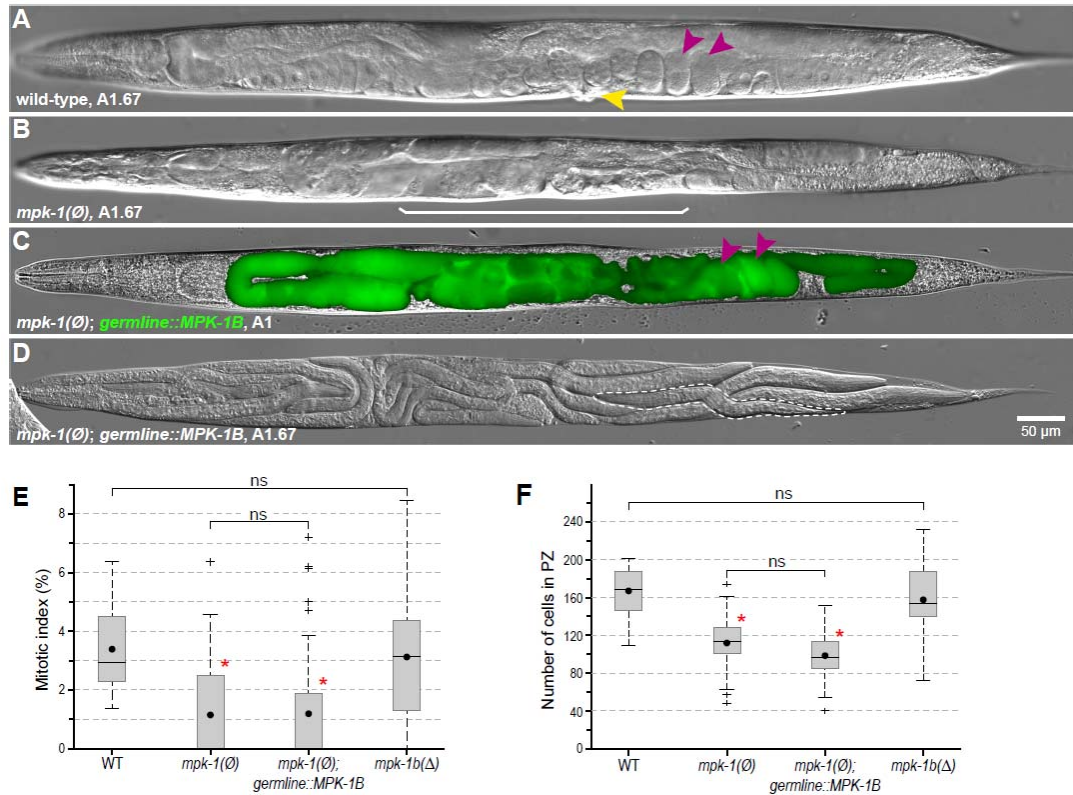


Figure 20 : Figure 3 de l'article. Germline MPK-1B does not promote GSC proliferation.
Voir description détaillée dans l'article.

L'isoforme MPK-1A promeut la prolifération des CSG de manière cellule non-autonome

Une fois que nous avons su que l'isoforme *mpk-1B* est celui présent dans la lignée germinale, on s'est demandé si l'isoforme *mpk-1A* agissait de façon cellulaire non-autonome, depuis un tissu somatique, pour promouvoir la prolifération des CSG. Pour vérifier cela, nous avons étiqueté une protéine des muscles avec du mCherry dans le mutant *mpk-1*. Ensuite, nous avons tenté d'insérer un transgène qui récupère le gène *mpk-1A* dans presque tous les tissus somatiques du ver : le soma en entier, la gonade somatique, l'intestin, les neurones, l'hypoderme et les muscles. De plus, nous avons mesuré les IM et la quantité de CS dans la zone de transition de toutes les souches mutantes générées et du WT (Fig. 20E-F).

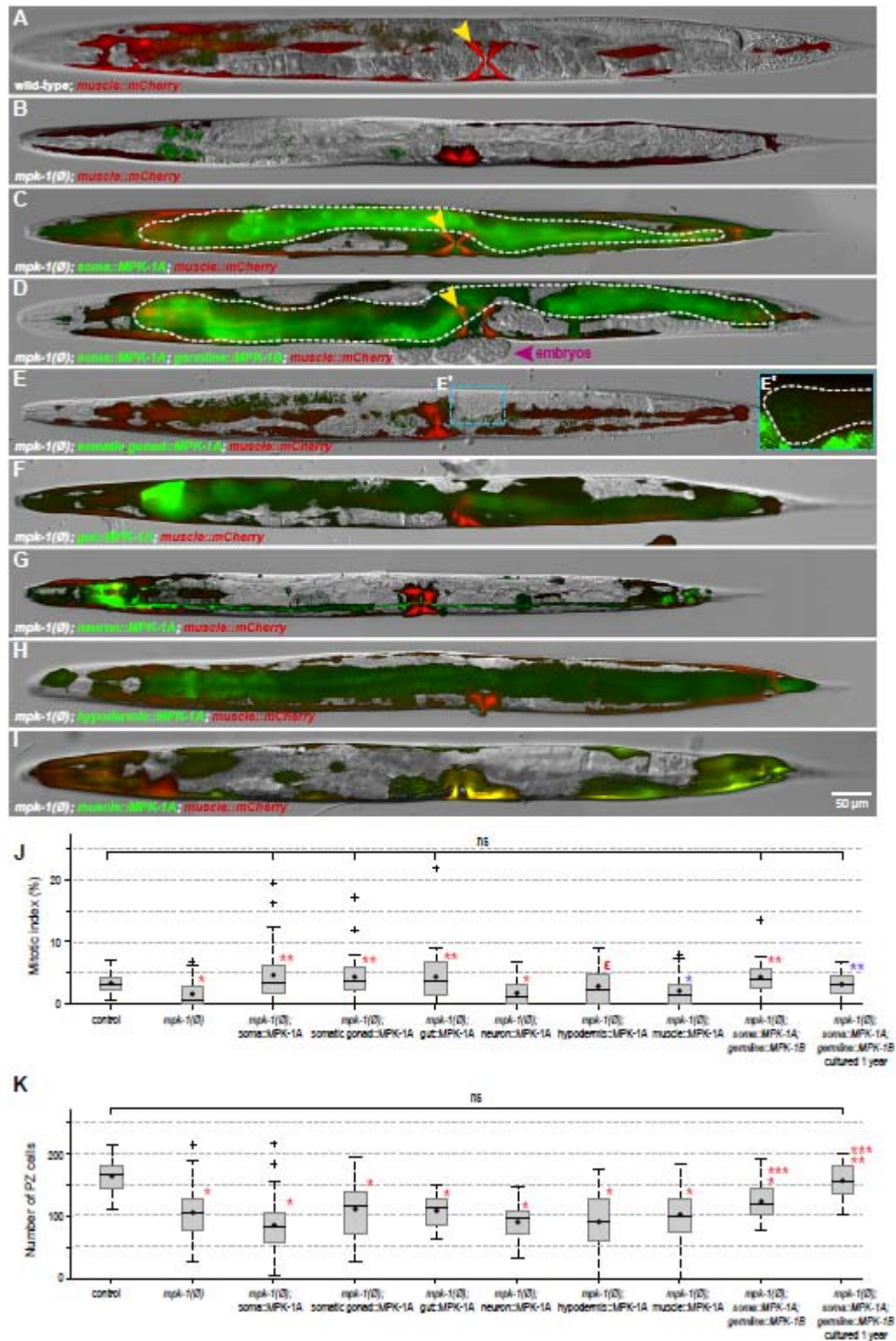


Figure 21 : Figure 4 de l'article. Somatic MPK-1A promotes GSC proliferation non-autonomously. Voir description détaillée dans l'article.

La figure 21A montre un WT en tant que contrôle d'une vulve bien développée et d'une lignée germinale en santé. La figure 21B montre un mutant *mpk-1* avec des gamètes aberrants et une vulve non développée. La figure 21C montre le mutant *mpk-1* dans lequel le gène *mpk-1A* a été récupéré dans tout le soma. On y remarque que ce mutant arbore une vulve en santé tel un WT, sauf que ses gamètes sont toujours aberrants. La figure 21D montre le mutant *mpk-1* dans lequel les gènes *germline ::MPK-1B* et *soma ::MPK-1A* ont été insérés. Ce mutant récupère les phénotypes de gamètes aberrants et de vulve non développée. Effectivement, il est superficiellement WT. Bref, les figures 21A-D nous ont prouvé que l'isoforme MPK-1A agit dans le soma. À partir de là, il nous restait à savoir si c'est lui qui promeut la prolifération des CSG et à partir de quel(s) tissu(s).

Les figures 21E-I récupèrent l'isoforme *mpk-1A* dans le mutant *mpk-1* dans les tissus de la gonade somatique, de l'intestin, des neurones, de l'hypoderme et du muscle respectivement. On remarque que tous les tissus semblent contribuer à la formation d'une vulve adéquate. Sur ce sujet, nous savions déjà que *mpk-1* est requis dans les cellules précurseurs de la vulve pour sa formation [77]. De plus, dans tous les mutants, l'expression du marqueur GFP qui prouve que l'insertion du transgène s'est bien déroulée était satisfaisante.

La figure 21J montre les IM de toutes les souches des figures 21A-C et E-I. Évidemment, on y remarque que le mutant *mpk-1; soma ::MPK-1A* a un IM semblable à celui d'un WT et même chose pour les mutants *mpk-1; somatic gonad ::MPK-1A* et *mpk-1; gut ::MPK-1A*. Par contre, les autres mutants à tissu spécifique dans lesquels *mpk-1A* a été récupéré présentent toujours un IM faible. Ces résultats indiquent que *mpk-1A* promeut la prolifération des CSG de manière cellule non-autonome à partir des tissus de l'intestin et de la gonade somatique.

La figure 21K montre les quantités de CS en zone de transition de toutes les souches des figures 21A-C et E-I. Nous y remarquons qu'aucun mutant *mpk-1*, dans lequel *mpk-1A* a été récupéré dans un tissu spécifique du soma, ne semble restaurer le phénotype de quantité de CS en zone de transition bas du mutant *mpk-1*. Même chose pour le mutant

mpk-1; *soma::MPK-1A*. Suivant ces résultats, nous pensons que ce paramètre n'est probablement pas lié au rythme de prolifération des CSG.

L'isoforme MPK-1A régule l'élongation et le besoin en nourriture

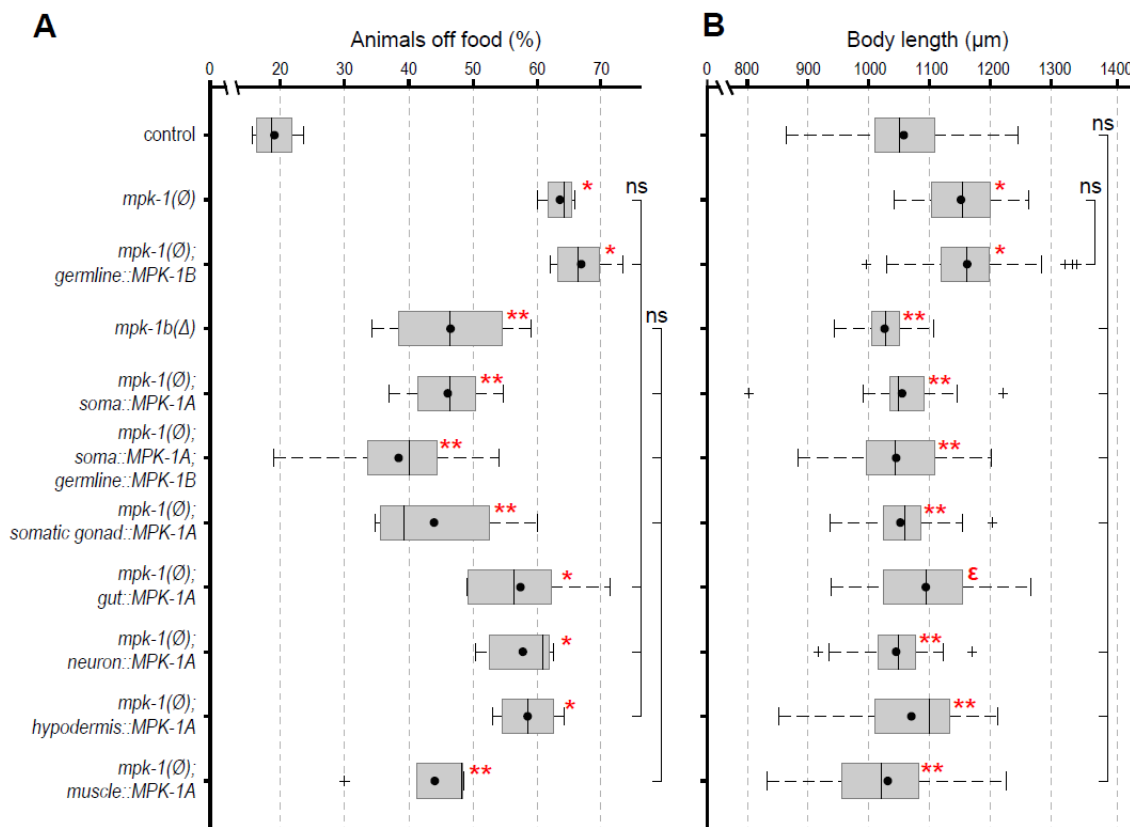


Figure 22 : Figure S5 de l'article. Regulation of food attraction and body length by somatic MPK-1A. Voir description détaillée dans l'article.

Pendant nos expériences, nous avons remarqué que le mutant *mpk-1* ne semblait pas se trouver souvent sur la nourriture et qu'il semblait plus long comparé au WT. Nous avons donc décidé de quantifier ces deux paramètres. Les figures 22AB présentent des résultats sur tous les mutants présents dans la figure 21 en plus du mutant *mpk-1B*.

La figure 22A montre les résultats concernant la portion d'animaux de chaque souche qui se trouvaient hors des bactéries lors des tests. Le WT n'avait seulement que 20 % de sa population hors des bactéries, alors que les mutants *mpk-1* et *mpk-1*;

germline ::MPK-1B en avaient plus de 60 %. Tous les mutants ayant de l'isoforme *mpk-1A* semblaient se tenir plus sur les bactéries, surtout ceux ayant l'isoforme MPK-1A dans leurs tissus des gonades somatiques et des muscles. Ces résultats appuient que l'isoforme *mpk-1B* n'a aucun impact sur le besoin en nourriture des vers.

La figure 22B montre les longueurs des différents mutants et du WT. On y remarque que les mutants *mpk-1* et *mpk-1; germline* ::MPK-1B sont plus longs que le WT. Encore une fois, tous les mutants ayant de l'isoforme MPK-1A semblaient être plus courts et ressemblaient au WT, sauf le mutant *mpk-1; gut* ::MPK-1A. Donc, la longueur des vers ne semble pas avoir de rapport avec leur rythme de prolifération.

Résumé de l'article en annexe

Sur la figure 16 on montre que dans le mutant *mpk-1(DT)* tous les anticorps détectent du MPK-1A/B et que dans le mutant *mpk-1B* les α -ERK et α -OLLAS montrent un très faible signal. Alors, on conclut que l'isoforme de MPK-1/MAPK majoritairement présent dans la lignée germinale est l'isoforme B.

Ensuite, on fait l'analyse des phénotypes du mutant *mpk-1B* afin de déterminer quel type de rôle le gène *mpk-1B* joue dans la lignée germinale. On découvre que le mutant *mpk-1B* n'est pas fertile. Donc, on en déduit que le gène *mpk-1B* est requis pour la fertilité de *C. elegans*.

Par la suite, on vérifie où et pourquoi le gène *mpk-1B* est requis. Pour ce faire, nous avons généré le mutant *mpk-1; germline* ::MPK-1B et vérifié ses phénotypes en les comparant à ceux du mutant *mpk-1B*. Le phénotype des gamètes aberrants a été récupéré, il a gardé un IM bas et une quantité de CS en zone de transition basse. Ces résultats indiquent que le gène *mpk-1B* dans la lignée germinale ne promeut pas la prolifération des CSG de *C. elegans*. Donc, puisque *mpk-1* promeut la prolifération des CSG sans *mpk-1B*, on en déduit que c'est le rôle de *mpk-1A*.

Donc, nous avons testé cette hypothèse en récupérant l'isoforme *mpk-1A* dans les divers tissus du soma possible dans le mutant *mpk-1*. Les résultats indiquent que *mpk-1A* est requis pour la prolifération des CSG de manière cellule non-autonome dans les tissus de l'intestin et de la gonade somatique. Nous savons également que cela est indépendant du besoin en nourriture et de l'élongation des animaux.

Discussion sur le fonctionnement de MPK-1A

La figure 23 montre un modèle de tout ce qui a été découvert dans notre publication. On y voit distinctement les rôles de MPK-1/MAPK pour la lignée germinale et le soma.

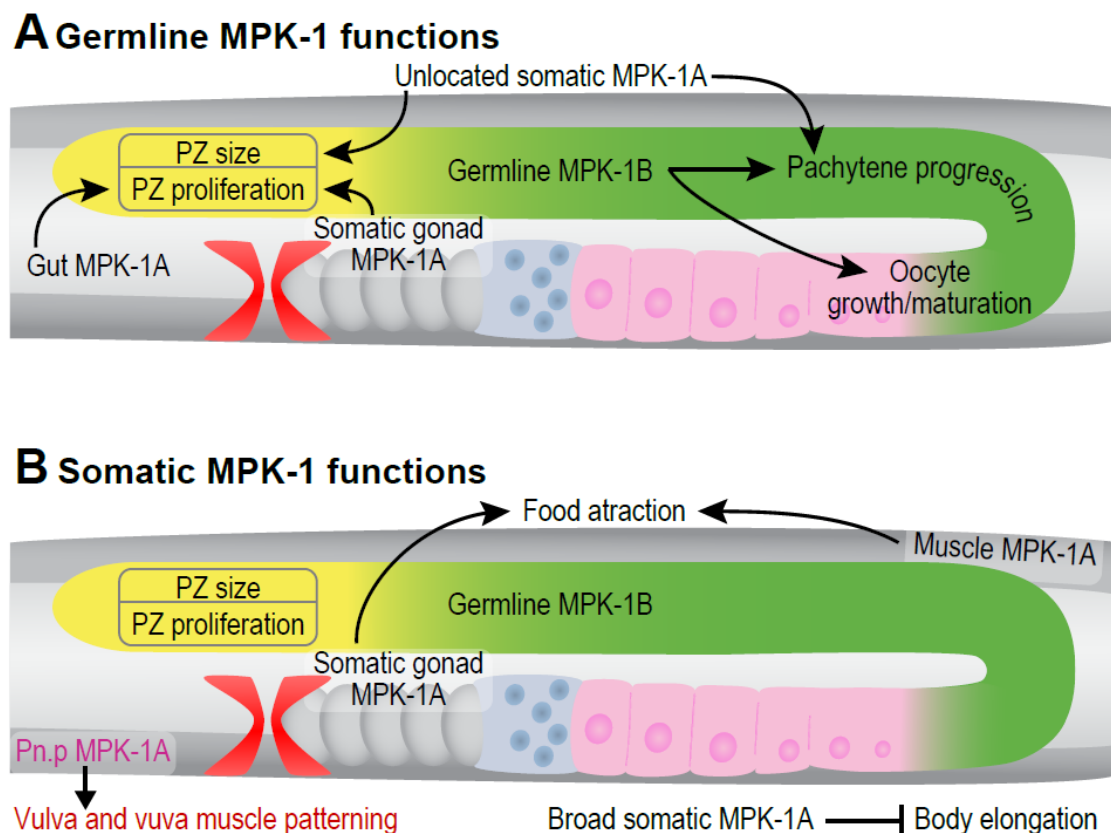


Figure 23 : Figure 5 de l'article. Models for cell autonomous and non-autonomous MPK-1 functions. Voir description détaillée dans l'article.

Dans la lignée germinale, l'isoforme MPK-1B sert de manière cellule autonome à promouvoir la progression des CS à travers le pachytène et à la maturation des ovocytes. En gros, il sert à former des gamètes normaux. Au contraire, l'isoforme MPK-1A qui peut agir à partir des gonades somatiques ou de l'intestin, donc de manière cellule non-autonome, est nécessaire à la prolifération des CSG jusqu'à ce qu'elles atteignent la zone du pachytène.

Dans le soma, l'isoforme MPK-1B ne joue aucun rôle et rappelons qu'il n'y est pas exprimé. L'isoforme MPK-1A, quant-à lui, est exprimé dans les tissus somatiques et est nécessaire à la formation d'une vulve adéquate à partir des cellules précurseurs de la vulve chez *C. elegans*. Il promeut aussi de façon non-autonome, depuis l'intestin ou la gonade somatique, la prolifération des CSG.

Comme on le sait déjà, la voie MAPK chez l'eucaryote régule des fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, le cycle cellulaire, la formation de tissu et l'apoptose [85]. Mais, nous avons découvert que les isoformes MPK-1A et MPK-1B ont des rôles distinctifs concernant la croissance des CS. Le rôle de l'isoforme B, de manière cellule autonome, serait de réguler la croissance et la maturation de la progéniture différenciée des CSG. Tandis que le rôle de l'isoforme A, de manière cellule non-autonome, serait de promouvoir la prolifération et la différenciation des CS.

Ces résultats nous laissent spéculer que chez l'humain, l'orthologue de MPK-1, ERK1/2, pourrait également promouvoir la prolifération de certains types de cellules souches, et ce, potentiellement aussi de façon cellulaire non-autonome. Cela pourrait aider à notre compréhension du fonctionnement des cellules souches dans le but de développer des options thérapeutiques. Par ailleurs, comme un dérèglement de la prolifération des CGS peut mener à un cancer, et que l'activité d'ERK1/2 est souvent augmentée dans les tumeurs cancéreuses, cela pourrait aussi nous permettre d'émettre de nouvelles hypothèses concernant le développement de tumeurs chez les mammifères. Par contre, des recherches sur les isoformes de MPK-1 dans plusieurs autres organismes seront nécessaires afin de mieux définir sa relation exacte avec les cellules souches.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Qu W., Ren C. et al. Reliability analysis of the Ahringer *Caenorhabditis elegans* RNAi feeding library: a guide for genome-wide screens. *BMC Genomics* 2011, 12:170. PMID: 21453524 DOI: 10.1186/1471-2164-12-170
2. Brenner S. Nobel lecture. Nature's gift to science. *Biosci. Rep.* 2003, 23(5-6):225-37. PMID: 15074543. DOI: 10.1023/b:bire.0000019186.48208.f3
3. Sulston J. E. C. *elegans*: the cell lineage and beyond. *Biosci. Rep.* 2003, 23(2-3):49-66. PMID: 14570376. DOI: 10.1023/a:1025568106095
4. Horvitz H. R. Nobel lecture. Worms, life and death. *Biosci. Rep.* 2003, 23(5-6):239-303. PMID: 15074544. DOI: 10.1023/b:bire.0000019187.19019.e6
5. Gregor M. Versuche über Pflanzenhybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn. Bd. IV für das Jahr 1866, Abhandlungen*, 3–47. DOI: 10.1534/genetics.116.195198
6. Sulston J. E. et Brenner S. The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974, 77:95–104. PMID: 4858229
7. Allen R. D., David G. B. et Nomarski G. The zeiss-Nomarski differential interference equipment for transmitted-light microscopy. *Z Wiss Mikrosk.* 1969, 69(4):193–221. PMID: 5361069
8. Sulston J. E. et Horvitz H. R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 1977, 56: 110–156. PMID: 838129 DOI: 10.1016/0012-1606(77)90158-0
9. Horvitz H. R. et Sulston J. E. Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1980, 96:435-54. PMID: 7262539
10. Sulston J. E. et Horvitz H. R. Abnormal cell lineages in mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 1981 82:41–55. PMID: 7014288 DOI: 10.1016/0012-1606(81)90427-9
11. Horvitz H. R., Ellis H. M. et Sternberg P. Programmed cell death in nematode development. *Neuroscience Commentaries* 1982, 1: 56–65.
12. Fire A. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ.* 2007, 14:1998–2012. PMID: 18007671 DOI: 10.1038/sj.cdd.4402253
13. Mello C. Return to the RNAi world: rethinking gene expression and evolution. *Cell Death Differ.* 2007, 14:2013–2020. PMID: 18007672 DOI: 10.1038/sj.cdd.4402252

14. Fire A. Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* 1986, 5:2673-2680. PMID: 16453714
15. Mello C. et Fire A. DNA transformation. *Methods Cell Biol.* 1995 48:451-482. PMID: 8531738
16. Fire A., Xu S. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998, 391(6669):806-11. PMID: 9486653 DOI: 10.1038/35888
17. Tabara H., Sarkissian M. et al. The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 1999, 99(2):123-32. PMID: 10535731 DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81644-xF
18. Grishok A., Pasquinelli A. E. et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 2001, 106(1):23-34. PMID: 11461699 DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00431-7
19. Yigit E., Batista P. J. et al. Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* 2006, 127(4):747-57. PMID: 17110334 DOI: 10.1016/j.cell.2006.09.033
20. Grishok A., Tabara H. et Mello C. C. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* 2000, 287(5462):2494-7. PMID: 10741970 DOI: 10.1126/science.287.5462.2494
21. Chalfie M. GFP: Lighting up life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106(25):10073–10080. PMID: 19553219 DOI: 10.1073/pnas.0904061106
22. Chalfie M., Tu Y., et Prasher D. C. Glow Worms – A New Method of Looking at *C. elegans* Gene Expression. *Worm Breeder's Gazette* 1993, 13. <http://www.wormbook.org/wli/wbg13.1p19/>, consulté le 5 avril 2020.
23. Chalfie M., Tu Y. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994, 263:802–805. PMID: 8303295 DOI: 10.1126/science.8303295
24. Zhang Y., Ma C. et al. Identification of genes expressed in *C. elegans* touch receptor neurons. *Nature* 2002, 418:331–335. PMID: 12124626 DOI: 10.1038/nature00891
25. Sukoyan M. A., Vatolin S. Y., et al. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. *Embryo Dev.* 1993, 36(2):148–58. PMID: 8257564 DOI: 10.1002/mrd.1080360205
26. Larijani B., Esfahani E. N., et al. Stem cell therapy in treatment of different diseases. *Acta Medica Iranica.* 2012, 50(2):79–96. PMID: 22359076
27. Jessup A. C., Baly E. C. et al. The Electrical Forces of Mitosis and the Origin of Cancer. *Biochem. J.* 1909, 4(5-7):191–232. PMID: 16742139 DOI: 10.1042/bj0040191

28. Narbonne P., Maddox P. S. et Labbé J.-C. DAF-18/PTEN locally antagonizes insulin signalling to couple germline stem cell proliferation to oocyte needs in *C. elegans*. *Development* 2015, 142:4230-4241. PMID: 26552888 DOI: 10.1242/dev.130252
29. Bloushtain-Qimron N. Epigenetic patterns of embryonic and adult stem cells. *Cell Cycle*. 2009, 8:809–17. PMID: 19229128 DOI: 10.4161/cc.8.6.7938
30. Amps K., Andrews P. W., et al. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat. Biotechnol.* 2011, 29(12):1121–44. PMID: 22119741 DOI: 10.1038/nbt.2051
31. *Caenorhabditis elegans*, WormBook – THE ONLINE REVIEW OF *C. elegans* BIOLOGY, <http://www.wormbook.org/>, consulté le 14 mars 2020.
32. Hansen D. et Pilgrim D. Sex and the single worm: sex determination in the nematode *C. elegans*. *Elsevier* 1999, 83:(1-2), 3-15. PMID: 10507838 DOI: 10.1016/s0925-4773(99)00024-6
33. Breeding Strategies for Maintaining Colonies of Laboratory Mice, A Jackson Laboratory Resource Manual, 2009, <https://www.jax.org>, consulté le 9 mai 2021.
34. David S. F., Dan S. et al. *Worm Breeding for Dummies*, A guide to genetic mapping in *C. elegans*, 2001, consulté le 9 mai 2021.
35. Herman R. K. Introduction to sex determination, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community. WormBook 2005. doi/10.1895/wormbook.1.71.1
36. Zevian S. C. et Yanowitz J. L. Methodological considerations for heat shock of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 2014, 1;68(3):450-7. PMID: 24780523 DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.04.015
37. Sydney B. The genetics of *Caenorhabditis Elegans*. *Genetics* 1974, 77(1):71-94. PMID: 4366476
38. Altun Z. F., Herndon L. A. et al. *WormAtlas*, 2002-2021, <http://www.wormatlas.org>, consulté le 7 mai 2021.
39. Kimble J. et Hirsh D. The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 1979, 70(2):396-417. PMID: 478167 DOI: 10.1016/0012-1606(79)90035-6
40. Hubbard E. J. A. et Greenstein D. Introduction to the germ line, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community. WormBook 2005. doi/10.1895/wormbook.1.18.1
41. Wong M. C. et Schwarzbauer J. E. Gonad morphogenesis and distal tip cell migration in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2012, 1(4):519-31. PMID: 23559979 DOI: 10.1002/wdev.45

42. Kopan R. et Ilagan M. X. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009, 17;137(2):216-33. PMID: 19379690 DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.045
43. Crittenden S. L., Bernstein D. S. et al. A conserved RNA-binding protein controls germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2002, 6;417(6889):660-3. PMID: 12050669 DOI: 10.1038/nature754
44. Lamont L. B., Crittenden S.L. et al. FBF-1 and FBF-2 regulate the size of the mitotic region in the *C. elegans* germline. *Dev Cell*. 2004, 7(5):697-707. PMID: 15525531 DOI: 10.1016/j.devcel.2004.09.013
45. Lee M. H., Hook B. et al. Conserved regulation of MAP kinase expression by PUF RNA-binding proteins. *PLoS Genet*. 2007, 28;3(12):e233. PMID: 18166083 DOI: 10.1371/journal.pgen.0030233
46. Kimble J. et Seidel H. *C. elegans* germline stem cells and their niche, StemBook, 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK174453/> DOI: 10.3824/stembook.1.95.1, consulté le 19 avril 2021.
47. Narbonne P. et Roy R. Inhibition of germline proliferation during *C. elegans* dauer development requires PTEN, LKB1 and AMPK signalling. *Development* 2006 133: 611-619. PMID: 16407400 DOI: 10.1242
48. Korta D. Z., Tuck S. et Hubbard E. J. S6K links cell fate, cell cycle and nutrient response in *C. elegans* germline stem/progenitor cells. *Development*. 2012, 139(5):859-70. PMID: 22278922 DOI: 10.1242/dev.074047
49. Michaelson D., Korta D.Z. et al. Insulin signaling promotes germline proliferation in *C. elegans*. *Development*. 2010, 137(4):671-80. PMID: 20110332 DOI: 10.1242/dev.042523
50. Dalfó D., Michaelson D. et Hubbard E. J. Sensory regulation of the *C. elegans* germline through TGF- β -dependent signaling in the niche. *Curr Biol*. 2012, 24;22(8):712-9. PMID: 22483938 DOI: 10.1016/j.cub.2012.02.064
51. Salinas L. S., Maldonado E. et Navarro R. E. Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ*. 2006, 13(12):2129-39. PMID: 16729024 DOI: 10.1038/sj.cdd.4401976
52. Hubbard E. J. A. *Caenorhabditis elegans* germ line: a model for stem cell biology. *Dev. Dyn*. 2007 236(12):3343-57. PMID: 17948315 DOI: 10.1002/dvdy.21335
53. Angelo G. et Van Gilst M. R. Starvation protects germline stem cells and extends reproductive longevity in *C. elegans*. *Science* 2009, 13;326(5955):954-8. PMID: 19713489 DOI: 10.1126/science.1178343
54. Seidel H. S. et Kimble J. The oogenic germline starvation response in *C. elegans*. *PLoS One* 2011, 6(12):e28074. PMID: 22164230 DOI: 10.1371/journal.pone.0028074

55. Kimble J. et Crittenden S. L. Controls of germline stem cells, entry into meiosis, and the sperm/oocyte decision in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007, 23:405-33. PMID: 17506698 DOI: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123326
56. Kadyk L. C. et Kimble J. Genetic regulation of entry into meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 1998, 125(10):1803-13. PMID: 9550713
57. Suh N., Jedamzik B. et al. The GLD-2 poly(A) polymerase activates *gld-1* mRNA in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103(41):15108-12. PMID: 17012378 DOI: 10.1073/pnas.0607050103
58. Yamanaka A., Yada M. et al. Multiple Skp1-related proteins in *Caenorhabditis elegans*: diverse patterns of interaction with Cullins and F-box proteins. *Curr Biol.* 2002, 12(4):267-75. PMID: 11864566 DOI: 10.1016/S0960-9822(02)00657-7
59. Luitjens C., Gallegos M. et al. CPEB proteins control two key steps in spermatogenesis in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2000, 14(20):2596–2609. PMID: 11040214 DOI: 10.1101/gad.831700
60. Morgan C. T., Noble D. et Kimble J. Mitosis-meiosis and sperm-oocyte fate decisions are separable regulatory events. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013, 110(9):3411-6. PMID: 23401507 DOI: 10.1073/pnas.1300928110
61. Greenstein, D. Control of oocyte meiotic maturation and fertilization, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community. *WormBook* 2005. doi/10.1895/wormbook.1.53.1
62. Praitis V., Casey E. et al. Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 2001;157(3):1217–1226. PMID: 11238406
63. Kimble J., Hodgkin J. et al. Suppression of an amber mutation by microinjection of suppressor tRNA in *C. elegans*. *Nature* 1982, 299:456–458. PMID: 7121584 DOI: 10.1038/299456a0
64. Dickinson D. J. et Goldstein B. CRISPR-Based Methods for *Caenorhabditis elegans* Genome Engineering. *Genetics* 2016, 202(3):885-901. PMID: 26953268 DOI: 10.1534/genetics.115.182162
65. Hartman P. S., Barry J. et al. Ethyl methanesulfonate induces mutations in *Caenorhabditis elegans* embryos at a high frequency. *Elsevier* 2014, 44-48:766-767. PMID: 25847271 DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2014.05.011
66. Fire A., Albertson D. et al. Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 1991, 113:503-514. PMID: 1782862
67. Fire A., Xu S. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998, 391:806-811. PMID: 9486653 DOI: 10.1038/35888

68. Narbonne P., Maddox P. S. et Labbé J.-C. DAF-18/PTEN signals through AAK-1/AMPK to inhibit MPK-1/MAPK in feedback control of germline stem cell proliferation. *PLoS Genet.* 2017, 13(4). DOI: 10.1371/journal.pgen.1006738
69. Apfeld J., O'Connor G. et al. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2004, 18(24):3004-9. PMID: 15574588 DOI:10.1101
70. Couteau F., Nabeshima K. et al. A component of *C. elegans* meiotic chromosome axes at the interface of homolog alignment, synapsis, nuclear reorganization, and recombination. *Curr. Biol.* 2004, 14:585-592. PMID: 15062099 DOI: 10.1016/j.cub.2004.03.033
71. Ferguson E. L. et Horvitz H. R. Identification and characterization of 22 genes that affect the vulval cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 1985, 110(1):17-72. PMID: 3996896
72. Carl Zeiss Innovationszentrum für Messtechnik GmbH | Bertolt-Brecht-Allee 24 | D-01309 Dresden (Germany) | www.zeiss.com © Carl Zeiss Innovationszentrum für Messtechnik GmbH 2009
73. Leica Microsystems CMS GmbH | Am Friedensplatz 3 | D-68165 Mannheim (Germany) | www.leica-microsystems.com © 1997-2015 Leica Microsystems CMS GmbH. All rights reserved.
74. Swan K. A., Curtis D. E., et al. High-throughput gene mapping in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res.* 2002, 12(7):1100-1105. PMID: 12097347 DOI: 10.1101/gr.20890
75. Minevich G., Park D. S., et al. CloudMap: a cloud-based pipeline for analysis of mutant genome sequences. *Genetics* 2012, 192(4):1249-1269. PMID: 23051646 DOI: 10.1534/genetics.112.144204
76. Vara-Ciruelos D., Russell F. M. et Hardie D. G. The strange case of AMPK and cancer: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Open Biol.* 2019, 26;9(7):190099. PMID: 31288625 DOI: 10.1098/rsob.190099
77. de la Cova C., Townley R. et al. A Real-Time Biosensor for ERK Activity Reveals Signaling Dynamics during *C. elegans* Cell Fate Specification. *Dev. Cell* 2017, 11:42(5):542-553. PMID: 28826819 DOI: 10.1016/j.devcel.2017.07.014
78. Lopez AL 3rd, Chen J, Joo HJ, et al. DAF-2 and ERK couple nutrient availability to meiotic progression during *Caenorhabditis elegans* oogenesis. *Dev. Cell.* 2013, 27(2):227-240. PMID: 24120884 DOI: 10.1016/j.devcel.2013.09.008
79. Szymczak A. L., Workman C. J. et al. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nature biotechnology* 2004, 22:589–594. PMID: 15064769 DOI: 10.1038/nbt957

80. Horvitz H. R. et Sulston J. E. Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1980, 96:435-54. PMID: 7262539
81. Eisenmann, D. M. et Kim S. K. Mechanism of activation of the *Caenorhabditis elegans* ras homologue let-60 by a novel, temperature-sensitive, gain-of-function mutation. *Genetics* 1997, 146:553-65. PMID: 9178006
82. Cell Signaling Technology – MAPK/Erk in Growth and Differentiation | Cell Signaling Technology, <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-pi3k-akt-mapk-signaling/mapk-erk-in-growth-and-differentiation/pathways-mapk-erk>, consulté le 1^{er} mai 2020.
83. *Caenorhabditis elegans*, WormBook – The *C. elegans* intestine, http://www.wormbook.org/chapters/www_intestine/intestine.html, consulté le 20 mars 2020.
84. Robinson-Thiewes et al. (In Press) *Cell Reports* (Article en annexe)
85. Guo, Y., Pan, W. et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review), *Experimental and Therapeutic Medicine* 2020, 19(3), <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>

ANNEXE A

NON-AUTONOMOUS REGULATION OF GERMLINE STEM CELL PROLIFERATION BY SOMATIC MPK-1/MAPK ACTIVITY IN *C. ELEGANS*

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue *Cell Reports*.

La référence de cet article est la suivante : Robinson-Thiewes et al. (In Press) *Cell Reports*.

Contribution des auteurs

Sarah Robinson-Thiewes¹◇, Benjamin Dufour²◇, Pier-Olivier Martel²◇,
Xavier Lechasseur², Amani Ange Danielle Brou², Vincent Roy^{2,3}, Yunqing Chen²,
Judith Kimble¹ & Patrick Narbonne^{2,3*}

¹ Department of Genetics, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA.

² Département de Biologie Médicale, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada.

³ Département de Biologie Moléculaire, de Biochimie Médicale et de pathologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada.

◇ These authors contributed equally.

* Correspondence and requests for strains should be addressed to:
patrick.narbonne@uqtr.ca

Résumé de l'article

Extracellular signal-regulated kinase (ERK)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a major positive regulator of cell proliferation that is often upregulated in cancer. Yet few studies have addressed ERK/MAPK regulation of proliferation within a complete organism. The *C. elegans* ERK/MAPK ortholog MPK-1 is best known for its control of somatic organogenesis and germline differentiation, but it also stimulates germline stem cell proliferation. Here we identify tissue-specific MPK-1 isoforms and characterize their distinct roles in germline function. The germline-specific MPK-1B isoform promotes germline differentiation, but has no apparent role in germline stem cell proliferation. By contrast, the soma-specific MPK-1A isoform promotes germline proliferation non-autonomously. Indeed, MPK-1A functions in the intestine or somatic gonad to promote germline proliferation, independently of its other known roles. We propose that a non-autonomous role of ERK/MAPK in stem cell proliferation may be conserved across species and other tissue types, with major clinical implications for cancer and other diseases.

Article

Non-autonomous regulation of germline stem cell proliferation by somatic MPK-1/MAPK activity in *C. elegans*

Introduction

The extracellular signal-regulated kinase (ERK)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) is the downstream effector of a conserved oncogenic pathway that is amongst the most often upregulated in cancer¹⁻³. Conversely, mutations that inactivate ERK/MAPK are seldom found in tumours, consistent with a key role of this kinase in proliferation^{2, 4}. The prevailing paradigm is that activated ERK/MAPK functions cell autonomously, responding to growth factors in the same cells where it promotes proliferation^{5, 6}. However, the role of ERK/MAPK in stem cells, including mammalian embryonic stem cells, has been perplexing. Most evidence indicates that ERK/MAPK is dispensable for stem cell proliferation, but is required for differentiation⁷⁻¹⁰. Although loss of ERK1/2 in mammalian embryonic stem cells reduces their proliferation in culture, that effect may be secondary to genomic instability¹¹⁻¹³. The effect of ERK/MAPK on stem cell proliferation in an organism remains largely unexplored.

We have investigated how ERK/MAPK affects stem cell proliferation in *C. elegans*. The genome of this small nematode possesses a single ortholog of mammalian ERK1/2 MAPKs, MPK-1, which has been investigated for years by classical genetic analyses. In *mpk-1(ø)* null mutants, several somatic organs fail to develop normally (*e.g.* vulva)¹⁴⁻¹⁶, and the germline fails to progress through the pachytene stage of the meiotic cell cycle, which causes sterility¹⁷⁻¹⁹. A more recently discovered defect in *mpk-1(ø)* mutants is that proliferation of germline stem cells (GSCs) occurs at a lower than normal rate, though it continues into adulthood^{18, 20}. Therefore, as in other species and other stem cell types, nematode ERK/MAPK is essential for differentiation but not for stem cell proliferation.

The *C. elegans* adult gonad has a simple architecture. Two U-shaped gonadal arms house the germline (Fig. 1A, left), where germ cell maturation occurs along a

distal-proximal axis (Fig. 1A, right). A pool of proliferative GSCs is maintained at the distal end within a somatic niche; as GSC daughters leave the niche, likely displaced by proliferation, they begin differentiation and progressively mature into gametes at the proximal end²¹⁻²⁵. GSCs, together with their proliferating progeny span a region in the distal gonad termed the progenitor zone (PZ) (Figure 1A, right). The rate of GSC proliferation is inferred from the mitotic index measured across the PZ^{20, 21, 26, 27}. In adult hermaphrodites, GSC proliferation rates influence distal-to-proximal germ cell flow, and are thus linked to the pace of oocyte production²⁸. Once germ cells leave the progenitor zone, they proceed through meiotic prophase and undergo gametogenesis, making sperm as larvae and oocytes in adults.

C. elegans GSC proliferation rates are controlled jointly by ERK/MAPK (see above) and insulin/IGF-1 signaling (IIS) (Fig. 1B). IIS promotes stem cell proliferation downstream of nutrient uptake (Fig. 1B), a regulation conserved in *C. elegans*, *Drosophila* and likely mammals²⁹⁻³⁵. Although IIS ligands are produced by various tissues in *C. elegans*, the single insulin/IGF-1 receptor DAF-2 acts within the germline to promote GSC proliferation by inhibiting the Forkhead transcription factor DAF-16/FOXO^{20, 33}. Thus, downstream IIS effectors act cell autonomously. Yet, neither nutritional status nor systemically acting growth factors, like insulin/IGF-1 ligands, fully account for rates of stem cell proliferation. For example, GSC proliferation plummets in well-fed *C. elegans* hermaphrodites that lack sperm, when oocytes accumulate abnormally in the proximal gonad^{20, 26, 36, 37}. This homeostatic lowering of GSC proliferation occurs even though IIS remains systemically active, and requires inhibition of MPK-1 signaling^{20, 26}. Since the homeostatic inhibition reduces GSC proliferation specifically in the sperm-depleted gonad arm²⁶, the downregulation of MPK-1 signaling must be localized to that arm. However, to date, the exact site of this MPK-1 inhibition within the animal has not been defined. Although molecular details may differ, homeostatic regulation is common in other stem cells, including *Drosophila* hematopoietic and gut stem cells, as well as mammalian hair follicle stem cells³⁸⁻⁴⁰.

An outstanding question is how animals achieve homeostatic control of stem cell proliferation. Here we show that in *C. elegans*, ERK/MAPK acts in the animal's gut and/or

somatic gonad to regulate the rate of GSC proliferation and that its action is thus non-autonomous. This finding challenges the prevailing view of ERK/MAPK autonomous control of proliferation and has potential to impact our understanding of how ERK/MAPK regulates proliferation in all organisms during development, homeostatic stem cell regulation, and tumour formation.

Results

MPK-1 has low but significant kinase activity in wild-type GSCs

MPK-1 promotes the high rate of GSC proliferation typical of young adult hermaphrodites²⁰. While MPK-1 protein is present in GSCs, its catalytically active form, diphosphorylated MPK-1 (dpMPK-1), has only been detected in meiotic germ cells and oocytes^{18, 19, 41}. This apparent lack of active MPK-1 in GSCs led us to investigate how MPK-1 affects germline proliferation. We considered three hypotheses: MPK-1 has a kinase-independent role in germ cell proliferation; active MPK-1 is present in GSCs but only at a previously undetected level; or MPK-1 promotes proliferation non-autonomously, from outside GSCs. To distinguish among these possibilities, we first used a sensitive *in vivo* ERK nuclear kinase translocation reporter (ERK-nKTR) to reassess MPK-1 activity in GSCs⁴². This GFP-tagged sensor harbors three MPK-1-specific phosphorylation sites that control its subcellular localization. When the reporter is unphosphorylated, GFP is retained within the nucleus, but when phosphorylated, GFP is exported to the cytoplasm (Fig. 1C). The ratio of cytoplasmic to nuclear GFP therefore provides an index of MPK-1 activity. A control reporter that lacks MPK-1 sites, ERK-nKTR(AAA), was used to establish the baseline ratio of cytoplasmic to nuclear GFP in each experiment⁴². Ratios above this baseline were scored as the MPK-1 activity index (see Methods for details).

We first assessed MPK-1 activity in the Progenitor Zone of wild-type adult hermaphrodites. Specifically, MPK-1 activity index was determined in PZ cells grouped by distance from the distal end (Fig. 1D). Indices were higher than baseline and similar throughout the PZ (Figs. 1E-F, S1). Our assay also detected the well-established activity in pachytene germ cells and oocytes (Fig. S1)^{18, 19, 41, 42}. The discovery of active MPK-1

in GSCs raised the possibility that MPK-1 acts autonomously to promote GSC proliferation.

We took advantage of three mutants to ask whether MPK-1 activity in GSCs is correlated with their proliferation. Such a correlation would be consistent with MPK-1 autonomous control of germline proliferation. The first two mutants had a lowered GSC proliferation rate due to activated homeostatic feedback, *lin-3(ø)* and *fog-1(ø)* mutants. The *lin-3(ø)* mutants accumulate endomitotic oocytes because they cannot ovulate, while *fog-1(ø)* mutants accumulate unfertilized oocytes because they cannot make sperm (Fig. S2)^{26, 43, 44}. As expected, the mitotic index was very low in both mutants (Fig. 1F). The PZ MPK-1 activity, on the other hand, was dissimilar in the two mutants. It was undetectable in *lin-3(ø)*, but was similar to wild-type in *fog-1(ø)* mutants (Fig. 1G). Therefore, PZ MPK-1 activity can be uncoupled from GSC proliferation. We next examined a mutant predicted to have higher than normal MPK-1 activity, a gain-of-function (*gf*) mutant in *let-60*, which encodes Ras, a central MPK-1 activator^{16, 17}. Surprisingly, MPK-1 activity in the PZ was undetectable in *let-60(gf)* (Fig. 1G). Yet GSC proliferation in *let-60(gf)* MI was about the same as wild-type (Fig. 1F). This result also uncouples MPK-1 activity in the PZ from GSC proliferation. We conclude therefore that the level of MPK-1 activity in GSCs is not correlated with their proliferation.

We next considered the possibility that MPK-1 might promote GSC proliferation from a different region within the germline tissue. This idea emerges from the fact that MPK-1 activity is stronger in the pachytene and oocyte regions than in the PZ. Indeed, MPK-1 activity levels in pachytene and oocytes of the selected mutants was correlated with their GSC MIs (Figs. 1F, S1L-M). Therefore, a non-autonomous action of MPK-1 from one germline region to another remains possible (though see below). Regardless, we conclude that MPK-1 activity in the GSCs themselves does not correlate with GSC proliferation

Germline-specific MPK-1B isoform autonomously promotes fertility

To investigate how MPK-1 promotes GSC proliferation in more depth, we delineated both the expression and function of its two isoforms. The *mpk-1* locus encodes two transcripts: *mpk-1b* is the longer of the two and possesses a unique first exon, while *mpk-1a* shares all other exons with *mpk-1b* (Fig. 2A)^{15, 16, 19}. A previous work demonstrated that *mpk-1b* is the main germline isoform, but did not fully address isoform-specific expression and germline function¹⁹. We first inserted epitope tags into the endogenous *mpk-1* locus using CRISPR/Cas9 gene editing⁴⁵. A single V5 tag was inserted into the *mpk-1b*-specific exon to label MPK-1B protein specifically, and two tandem OLLAS tags were inserted into the shared C-terminus to label both MPK-1A and MPK-1B (Fig. 2A). The wild-type version of this dual tagged locus is called *mpk-1(DT)*. We next deleted 125 bp of the *mpk-1b*-specific exon in *mpk-1(DT)* to create an isoform-specific frameshift (henceforth called *mpk-1b(Δ)*) (Fig. 2A). In parallel, we created a 2221 bp in-frame deletion in *mpk-1(DT)* to remove common coding regions of the two isoforms (henceforth *mpk-1(Δ)*) (Fig. 2A). These alleles allowed us to unambiguously determine where each isoform is expressed and to define their respective biological roles.

We investigated expression of MPK-1A and MPK-1B in dissected hermaphrodite gonads that were stained with α -ERK, α -V5 and α -OLLAS antibodies plus DAPI. These gonad arms include the entire germline tissue plus several somatic gonadal cells, most prominently 10 sheath cells. Some preparations included the extruded gut in addition to the gonad. We used α -ERK to recognize MPK-1 on its own, with or without an epitope tag^{18, 19}, and α -V5 and α -OLLAS to recognize epitope-tagged MPK-1. Wild-type gonads stained robustly with α -ERK, as previously reported^{18, 19}, but not with α -V5 or α -OLLAS (Figs. 2B, S3A). The *mpk-1(DT)* gonads, on the other hand, stained robustly with all three antibodies (Figs. 2C, S3B-C). The intense germline staining in both wild-type and *mpk-1(DT)* precluded visualization of staining in somatic gonadal cells. However, the *mpk-1(DT)* gut showed strong α -ERK and α -OLLAS staining, but lacked α -V5 staining (Fig. S3C). We next stained *mpk-1b(Δ)* gonads, which do not have MPK-1B or the V5 tag, but do still have OLLAS-tagged MPK-1A. The intense α -ERK, α -OLLAS, and α -V5 signals were lost across the germline in *mpk-1b(Δ)* gonads (Fig. 2D). Moreover,

α -ERK and α -OLLAS staining became visible in the somatic sheath cells (Figure 2D, orange arrowheads). Therefore, MPK-1A is the somatic isoform (expressed in gut and somatic gonad, but not germline), while MPK-1B is the germline isoform (expressed in germline, but not gut).

To investigate the biological function of the two isoforms, we first scored fertility and vulva formation. Wild-type and *mpk-1(DT)* animals were fertile, made a normal vulva and were otherwise indistinguishable (Fig. 3A). Thus, the tags have no apparent effect on MPK-1 function. By contrast, *mpk-1(Δ)* and *mpk-1b(Δ)* mutants were sterile and *mpk-1(Δ)*, but not *mpk-1b(Δ)*, mutants were vulvaless (Fig. 3A). The *mpk-1(Δ)* defects therefore match those of the established *mpk-1(\emptyset)* null allele, *mpk-1(ga117)*¹⁵, but *mpk-1b(Δ)* do not. Together, these data indicate that the germline-specific MPK-1B functions autonomously to promote fertility since its removal results in sterility. Moreover, the well-formed vulva in *mpk-1b(Δ)* mutants indicates that somatic MPK-1A is responsible for vulva development, where it also acts autonomously in the vulva precursor cells¹⁶.

Intriguingly, the morphologies of *mpk-1(Δ)* and *mpk-1b(Δ)* germlines were dramatically different. To investigate their differences, we stained dissected gonads from wild-type *mpk-1(Δ)* and *mpk-1b(Δ)* adult hermaphrodites with sperm and oocyte markers plus DAPI (Fig. 3B-D). Wild-type germlines were large with proliferating GSCs in the progenitor zone, neatly organized germ cells in the pachytene region, oocyte staining in a single file row of oocytes in the proximal gonad, and sperm staining restricted from oocyte staining (Fig. 3B; Table S1). By contrast, *mpk-1(Δ)* germlines were much smaller, had a disordered pachytene region, and failed to produce gametes (Fig. 3C; Table S1). This *mpk-1(Δ)* germline morphology is similar to that of *mpk-1(\emptyset)* mutants, reported previously^{18, 19}. The *mpk-1b(Δ)* germlines had one feature similar to *mpk-1(Δ)* and *mpk-1(\emptyset)*: the *mpk-1b(Δ)* pachytene region was disorganized, indicating a defect in pachytene progression (Figure 3D; Table S1). However, unlike *mpk-1(Δ)*, *mpk-1b(Δ)* germlines were large and appeared similar in size to wild-type (Fig. 3D-E). In addition, most *mpk-1b(Δ)* germlines initiated gamete formation (Fig. 3D). Thus, 95% of *mpk-1b(Δ)* germlines were positive for a sperm marker, and 66% were also positive for an oocyte marker (Table S1). Yet the sperm and oocytes were not arranged normally: cells staining

with the sperm marker were not spatially restricted to the proximal end, as in wild-type, but instead they were intermingled with malformed cells staining with the oocyte marker (Fig. 3D'-3D'''). We draw two conclusions from this data. First, MPK-1B is required for organization of the pachytene region, but can be dispensable for pachytene exit and the initiation of gametogenesis. Second, MPK-1A can initiate gametogenesis in *mpk-1b(Δ)* mutants, although the gametes are aberrant. Because MPK-1A is not expressed in the germline, its germline effects must be non-autonomous.

We were struck that some *mpk-1b(Δ)* gonad arms appeared larger than wild-type (compare Fig. 3B to D). To probe further, we calculated gonad arm volumes and counted germ nuclei in wild-type, *mpk-1(Δ)*, and *mpk-1b(Δ)* (Fig. 3E-F). As expected, *mpk-1(Δ)* arms were substantially smaller than wild-type by both volume and number of nuclei. The *mpk-1b(Δ)* gonadal arm, on the other hand, had a volume similar to that of the wild-type (Fig. 3E), but number of nuclei were reduced by ~25% compared to wild-type (Fig. 3F). Therefore, *mpk-1b(Δ)* mutants make a germline of comparable size to the wild-type, but with fewer nuclei. Because *mpk-1b(Δ)* retain MPK-1A activity, we infer that somatic MPK-1A promotes germline growth, both in terms of volume and germ cell number.

Germline MPK-1B does not promote GSC proliferation

We next tested the roles of MPK-1A and MPK-1B in GSC proliferation. To this end, we expressed GFP::MPK-1B in *mpk-1(∅)* (the *gal17* allele¹⁵) mutants (henceforth *germline::MPK-1B*), using a single-copy transgene driven by the germline-specific *mex-5* promoter^{46,47}. These animals possess MPK-1 activity in the germline due to the MPK-1B transgene, but lack MPK-1 activity in the soma due to the *mpk-1(∅)* mutation; as a result, this strain is effectively a null mutant for MPK-1A. The germline expression of GFP::MPK-1B rescued the *mpk-1(∅)* sterility, but did not rescue *mpk-1(∅)* vulval defects. The animals generated progeny, but without a vulva, could not extrude embryos from the uterus, forcing them to hatch inside their mother (Fig. 4A-D). The vulva defect in *germline::MPK-1B* confirms its lack of somatic MPK-1 activity. The *germline::MPK-1B* and *mpk-1b(Δ)* results are therefore complementary and together, they demonstrate that

MPK-1B is sufficient to promote progression through pachytene and form functional gametes. MPK-1B is also necessary for the formation of functional gametes. In addition, the results show that MPK-1B promotes germline function autonomously.

As might be expected for such a small germline, the GSC Mitotic Index in *mpk-1(ø)* mutants is lower than wild-type (Fig. 4E)^{18, 20}. The number of germ cells in the Progenitor Zone is also reduced in these mutants (Fig. 4F). Since germline MPK-1B was sufficient to restore fertility in *mpk-1(ø)* mutants, we asked whether it also restored the GSC MI and PZ cell numbers in *mpk-1(ø)* mutants. To this end, we measured MI and PZ cell numbers in *germline::MPK-1B* animals. Strikingly, despite rescuing fertility, germline MPK-1B did not restore either the MI (Fig. 4E) or number of germ cells in the PZ (Fig. 4F). The simple explanation was that MPK-1A must be required in the soma for both GSC MI and PZ size. To test this idea, we scored *mpk-1b(Δ)* mutants for these two traits. As expected, the GSC MI and PZ cell number were indistinguishable in *mpk-1b(Δ)* and wild-type (Fig. 4E-F). We draw several conclusions from these experiments. First, somatic MPK-1A is required for the normal number of adult PZ cells. Second, germline MPK-1B is not required for adults to achieve high GSC proliferation rates; the reduction in total germ cell number found in *mpk-1b(Δ)* germlines is therefore likely due to problems in meiotic progression. Third and most important, the somatic MPK-1A isoform is non-autonomously required to promote the high GSC proliferation typical of young adult hermaphrodites, while germline MPK-1B is dispensable.

MPK-1A promotes GSC proliferation non-autonomously from the gut and/or somatic gonad

To determine where MPK-1A acts in the soma to promote GSC proliferation, we turned to transgenic arrays driving MPK-1A expression in somatic tissues in the *mpk-1(ø)* background. Because these arrays are efficiently silenced in the germline^{48, 49}, expression was limited to somatic tissues. To follow array transmission, we used muscle-expressed mCherry (henceforth *muscle::mCherry*) as a co-transformation marker, which also provided vulva muscle landmarks (Fig. 5A-I, yellow arrows: normal). Our negative control expressed *muscle::mCherry* alone in *mpk-1(ø)* mutants and had no rescuing effect

(Fig. 5B). Our positive control carried muscle-expressed mCherry plus GFP::*MPK-1A* expressed in all somatic cells under control of the *sur-5* promoter (henceforth *soma>::MPK-1A*)⁵⁰. The *sur-5* promoter drove strong GFP::*MPK-1A* expression in the gut, and lower levels in all other somatic cell types (Fig. 5C). As expected, *soma>::MPK-1A* rescued vulva formation, albeit not in all animals likely due to mosaicism (Figs. 5A-C, S4; Table S2). Most importantly, *soma>::MPK-1A* restored the GSC Mitotic Index to that of *muscle>::mCherry* controls (Fig. 5J). The Progenitor Zone cell counts however remained lower than those of controls (Fig. 5K). We do not understand why PZ size was not restored, but transgenic mis-expression may play some role. Consistent with that possibility, *soma>::MPK-1A* sometimes induced a multivulva (Table S2), a common sign of MPK-1 hyperactivity¹⁵. Although able to restore GSC proliferation, *soma>::MPK-1A* could not restore fertility (Fig. 5A-C, Table S3), further confirming that germline MPK-1B is essential for germline function (Fig. 3A). Fertility and vulva development were both rescued only when *soma>::MPK-1A* and *germline>::MPK-1B* were combined into *mpk-1(ø)* mutants (Fig. 5D; Table S3). We conclude that somatic MPK-1A is sufficient to drive the high GSC proliferation typical of young adult hermaphrodites and therefore acts non-autonomously. In addition, the unexpected non-rescue of adult PZ size suggests that this parameter is likely regulated independently from the GSC proliferation rate.

We next used tissue-specific promoters to drive MPK-1A in individual somatic tissues of *mpk-1(ø)* animals. Specifically, we used *rgef-1*, *dpy-7*, *elt-7*, *myo-3*, and *ckb-3* promoters to drive expression in the nervous system, hypodermis (hyp 7), gut, non-pharyngeal muscles and somatic gonad, respectively⁵¹⁻⁵⁵. We achieved high GFP::*MPK-1A* expression in the nervous system and non-pharyngeal muscles, intermediate levels in the hypodermis and gut, and lower levels in the somatic gonad of young adult hermaphrodites (Fig. 5E-I). Tissue-specific expression of MPK-1A in either the gut or somatic gonad fully rescued the germline Mitotic Index of *mpk-1(ø)* mutants (Fig. 5J). By contrast, expression in the nervous system, non-pharyngeal muscles or hypodermis had no significant effect on the MI (Fig. 5 J). As seen in *soma>::MPK-1A* animals, none of the tissue-specific promoters rescued PZ size (Fig. 5K). We conclude that MPK-1A acts either in the gut and/or in the somatic gonad to non-autonomously support the high GSC proliferation that is observed in young adult hermaphrodites.

MPK-1A promotes GSC proliferation independently of other known roles

In addition to the well-established *mpk-1(ø)* defects in vulval and germline development, we noticed two additional defects. The *mpk-1(ø)* mutants wandered outside the bacterial lawn much more often than wild-type (Fig. 6A), and their average body length was 10% longer than wild-type (Fig. 6B). We considered the possibility that one of these defects might be linked to the reduced GSC proliferation of *mpk-1(ø)* mutants. If true, these additional defects should be rescued concurrently with GSC proliferation.

We therefore asked whether these additional defects were always rescued concurrently with GSC proliferation in the MPK-1 variants we had created in this work. We found that MPK-1A expression in either the somatic gonad or muscles restored the wandering behavior of *mpk-1(ø)* mutants, whereas gut, neuron and hypodermis MPK-1A, or germline MPK-1B, had no noticeable effect (Fig. 6A). For body length, we found that MPK-1A expression in any somatic tissue (except for the gut) was sufficient to prevent excessive elongation, while germline MPK-1B had no significant effect (Fig. 6B). Overall, both defects were restored without a concurrent rescue of GSC proliferation, and conversely, GSC proliferation was restored without a concurrent rescue of the two defects (Figs. 5J-6). We therefore conclude that MPK-1A activity in the animal's gut and/or somatic gonad promotes GSC proliferation independently from preventing to wander off the food and undergo excessive body elongation.

Discussion

Our work dissects the largely non-overlapping roles of the *C. elegans* germline and somatic MPK-1 isoforms *in vivo*. First, we found MPK-1 activity within the GSCs and primed daughter cells using a sensitive ERK reporter; however, PZ MPK-1 activity did not always correspond to GSC proliferation rates. Second, we characterized the roles of the somatic MPK-1A and germline MPK-1B isoforms. We showed that germline MPK-1B is both necessary and sufficient for successful gamete differentiation and fertility but surprisingly, it does not promote GSC proliferation. Instead, somatic MPK-1A non-autonomously promotes proliferation, in addition to pachytene exit and partial gametogenesis. Third, we identify MPK-1A expression in the gut or somatic gonad as

sufficient for proliferation. Finally, we show that this gut or somatic gonad MPK-1A activity promotes GSC proliferation independently of other known *mpk-1(ø)* defects. We modeled how the MPK-1 isoform activities in specific tissues contribute to germline and somatic functions within the animal in Figure 7. Overall, we conclude that ERK/MAPK regulates stem cell proliferation exclusively in a cell non-autonomous manner *in vivo*, while stem cell differentiation is affected by ERK/MAPK both autonomously and non-autonomously. Specifically, we found that the cell autonomous role of ERK/MAPK in promoting stem cell differentiation was essential, while the non-cell autonomous contribution was not essential, and appeared to promote the efficiency of the differentiation process. These data have major implications in our general understanding of ERK/MAPK activity in both development and cancer.

In *C. elegans*, active ERK/MAPK is primarily found in the stem cell's differentiated progeny, and is autonomously essential for the successful completion of this differentiation process. It is however dispensable for stem cell proliferation, at least in the short term. Similarly, mammalian ERK-1/2 are autonomously essential for embryonic stem cell differentiation⁷⁻⁹. Yet, mammalian embryonic stem cells require cell autonomous ERK/MAPK for long term proliferation and maintenance in culture¹¹⁻¹³. Interestingly, our sensitive *in vivo* reporter revealed a small but significant MPK-1 activity in the GSCs and primed daughters. Our results may thus offer a means to reconcile these opposing observations. We suggest that limited ERK/MAPK activity may be required in stem cells for long term integrity. Consistent with this possibility, *let-60(gf)* animals, which have no significant MPK-1 activity in the PZ, show severe sterility⁵⁶.

Unexpectedly, somatic MPK-1A rescued proliferation but did not rescue PZ size. PZ size is the result of a combination of factors including the strength and extent of niche signaling and past proliferation. Although both ubiquitous somatic and gonad-specific promoters resulted in MPK-1A re-expression in the niche cell, it is possible that the achieved expression levels in this or other tissues were inappropriate to rescue PZ size. Interestingly however, the data demonstrated that the adult PZ size is regulated independently from GSC proliferation rates. As such one cannot drive reliable conclusions about past or present stem cell proliferation rates by solely examining the adult PZ size.

The data rather supports the view that adult PZ size likely depends more on the strength and extent of niche signalling than on the actual GSC proliferation rate. As such, niche signaling strength and extent may simply act to physically impose an upper limit to the size of the PZ reservoir, which cellular content is turned-over more or less rapidly depending on stem cell proliferation rates. Such GSC proliferation rates may primarily depend on the combinatorial effects of growth factors, including IIS and MPK-1 dependent signals^{20, 21, 26}.

Most interestingly, we found that somatic MPK-1A non-cell autonomously promotes GSC proliferation from the animal's gut and/or somatic gonad (Fig. 7A). Gap junctions connect the gut to the somatic gonad, and the somatic gonad to the germline, while the junctions between the somatic gonad and the germline are required for GSC proliferation⁵⁷. The connection between these tissues opens the possibility of an unidentified compound(s) downstream of MPK-1A, such as nutrients or metabolites, being modified or transported through the gut and/or somatic gonadal cells to stimulate GSC proliferation. Interestingly, it was reported that GSC proliferation in animals fed low levels of uridine and thymidine required cytidine deaminases specifically in the gut or somatic gonad⁵⁸, solidifying this gut-gonad-germline connection for GSC proliferation. Such MPK-1A-dependent GSC proliferation stimulating compound(s) would need to act in parallel to IIS²⁰, but independent of MPK-1 activity in GSCs.

Each gonad arm is able to independently inhibit GSC proliferation in cases where oocytes have accumulated in one particular arm, while this accomplished through the localized inhibition of MPK-1^{20, 26}. Because the gut is a continuous tissue that is equally connected to both gonad arms, but each arm is independent, and individually connected to the germline via GAP junctions, we favor a model where the somatic gonad controls homeostatic GSC proliferation in each arm. In mice, GAP junction openings are modulated by ERK/MAPK phosphorylation of connexins during epidermal wound healing, another homeostatic process that involves stem cells^{59, 60}. As such, ERK/MAPK could modulate gut and/or gonadal GAP junction openings to allow the unidentified GSC proliferation-stimulatory compounds to reach the germline. The proliferation rates of diverse stem cell populations in other species may be controlled by homologous

mechanisms, with stem cell proliferation rates ultimately reflecting the combined effects of the systemic (*i.e.* downstream of nutrient intake, via IIS) and localized (*i.e.* homeostatic regulation, impinging on MPK-1 signaling) information. Consistent with this, GSC proliferation in *Drosophila* is stimulated by nutrient uptake via IIS signaling³², while homeostatic inhibition of intestinal stem cells occurs through the inhibition of ERK/MAPK signaling⁶¹.

ERK/MAPK signaling tends to be upregulated in multiple types of human cancers¹⁻⁴. Yet, tumours are heterogeneous and only cancer stem cells can generate a new tumour upon transplantation^{62, 63}. The bulk of the tumour therefore likely consists of differentiated cancer stem cell progeny. Cancer stem cells may evolve from endogenous stem cells following replication errors⁶⁴⁻⁶⁶ and may thus retain stem cell assets. As such, cancer stem cells might require certain tissues or cells with elevated ERK/MAPK activity to ensure high proliferation – similar to the endogenous ERK/MAPK activity we describe in the *C. elegans* gut and somatic gonad. If so, chemotherapy targeting the ERK/MAPK pathway may either promote cancer stem cell quiescence non-autonomously through inhibition of the supporting tissue and/or suppress cancer growth by autonomously inhibiting the cancer stem cell's differentiated progeny. Chemotherapy specificity and effectiveness may thus be increased by targeting ERK/MAPK in the tissue supporting cancer stem cell proliferation and/or by inhibiting ERK/AMPK in the cancer stem cell's differentiated progeny.

Methods

***C. elegans* genetics**

Animals were maintained on standard NGM plates seeded with *E. coli* (OP50) and the Bristol isolate (N2) was used as wild-type throughout⁶⁷. All animals were scored as young adults with the following specifics. For Figs. 1, 4-5 and S1-S2, animals were maintained at 15°C, synchronized by picking late L4 stage larvae to a new plate⁶⁸, and upshifted to 25°C for 24 hours (unless otherwise specified) before they were harvested for assaying. For Figs. 2-3 and S3, animals were maintained at 20°C and were analyzed at

L4 + 24 hours. For Figs 6 and S4, animals were raised at 25°C from the L1 stage. All strains, alleles, transgenes and rearrangements used are listed in Table S4.

Plasmid constructions, transgenics and genome editing

We used the Gibson method⁶⁹ for all plasmid assembly, except for pUMP5, which was generated by T/A cloning of an RT-PCR product into pMR377, a modified pKSII-based vector, after opening it with *XcmI* to generate T-overhangs (a kind gift from Shaolin Li). The source DNA and primers that were used to generate all plasmids, as well as their micro-injection concentrations, are found in Table S5. Extra-chromosomal arrays were generated by regular micro-injections at a total concentration of 150-200 ng/μL, using pKSII as a filler DNA and pCFJ104[*Pmyo-3::mCherry*] (5 ng/μL) as a co-injection marker^{47, 48}. For the lines harboring pPOM5-9 altogether, each plasmid was injected at 15 ng/μL, in a single mix.

For single-copy insertion (*i.e. narSi2*), pNAR3 was co-injected with pDD122 in *unc-119(ed3)* animals for CRISPR/Cas9-mediated integration at ttTi5605 on LG II (+0.77)⁴⁶. A single line was obtained from > 200 micro-injections.

For editing the *mpk-1* locus, CRISPR/Cas9 was used according to previously described methods^{70, 71}. Repair templates and crRNAs are listed in Table S6. To create the *mpk-1(DT)*, an intermediate V5-tagged strain was first generated. The 2xOLLAS tag was subsequently inserted into the V5-tagged strain to create *mpk-1(DT)*. The *mpk-1(DT)* strain was used as the starting point to generate *mpk-1b(Δ)*, but the V5-tagged strain was used to generate *mpk-1(Δ)*. All CRISPR created *mpk-1* strains were outcrossed to N2 two times. The *mpk-1b(Δ)* and *mpk-1(Δ)* alleles were maintained over the *qC1[qIs26]* balancer. Full genotypes are listed in Table S4.

Quantification of germline MPK-1 activity

Following bleach synchronisation, all worms were grown at 25 °C until L4 + 24 hours (A1). Animals were collected and paralyzed in 4.15 mM (0.1%) Tetramisole in M9 buffer on a coverslip that was flipped onto a 3% agarose pad and sealed using VALAP

(1:1:1 Vaseline, lanolin and paraffin). A Leica confocal microscope TCS SP8 (Leica Microsystems) with a HC PL APO CS2 40x/1.30 numerical aperture oil objective was used for image collection. Bidirectional scanning at 400 Hz, in sequential mode, combined with a 0.8 μm Z-stack step was used to image each gonad. Only the anterior gonad arm of each worm was acquired. ERK-nKTR::GFP was acquired using a 488 nm solid-state laser at 10% intensity, for all strains, except *fog-1(\emptyset)*, which was at 15% intensity. PMT gate was set at 673 gain and at 559.5 \pm 21.5 nm for all strains. *H2B::mCherry* was acquired using a 552 nm solid-state laser at 5% intensity using a HyD gate at 50% gain and at 610 \pm 21 nm.

Image processing and data analysis were done with Fiji. For the PZ, cells were grouped based on distance from the distal tip (1-5, 6-10, 11-15, and 1-15). Five cells were analysed per gonad, distributed one per three cell diameter regions. For the pachytene region, five cells per gonad were randomly chosen. For oocytes, five cells per gonad were analysed starting from the -2 oocyte to avoid sperm-activated oocytes. Variability in the *H2B::mCherry* intensities between germ cells and across germline regions (see Fig. S1) prevented us from using the previously published quantification method, developed for vulva precursor cells⁴². Thus, for all germ cells, the mean GFP fluorescence signal intensity was measured for three randomly-chosen circular cytoplasmic areas (0.5 μm for GSCs and pachytene; 4 μm for oocytes) and for the whole nucleus. Cell selection and cytoplasmic area selections were made using the *mCherry* channel to avoid introducing any user-bias after seeing the GFP channel. The three cytoplasmic GFP mean intensity measures were averaged and divided by the single mean nuclear intensity measurement to obtain an MPK-1 activity index for each cell. Five cells of each types were averaged for all strains. For each genotype, the ERK-nKTR activity index for each region was first normalized to its ERK-nKTR(AAA) control, then to the wild-type ERK-nKTR(AAA) control for comparison across different genotypes. As germline autofluorescence accounted for less than 1% of the GFP signal for all samples, background subtractions were omitted.

GSC pool size and mitotic index

GSC pool size and MIs of young adult hermaphrodites were evaluated as previously described^{20, 26}. For every genotype for which we had previously published an A1 MI result (N2, *fog-1(ø)*, and *mpk-1(ø)*)^{20, 26}, we did not detect a significant difference between the newer and older datasets ($P > 0.05$; Kruskal-Wallis rank sum test).

Immunostaining and fluorescence quantification

Sperm/oocyte staining: Briefly, worms raised at 20 °C were picked as mid-L4s to a fresh plate, 24 hours prior to staining. Hermaphrodites were anesthetized in 0.25 µM levamisole in PBST (1xPBS + 0.1% Tween20). Gonads were collected and fixed in 3.7% formaldehyde in PBST for 15 minutes while rocking at room temperature (RT). After washing in 1 mL PBST, gonads were permeabilized in PBST+0.1% Triton-X and incubated for 10 minutes, rocking at RT. Gonads were washed 3x 10 minutes in PBST and blocked in PBST+0.5%BSA (block) for 1 hour. After the block was removed, samples were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies diluted in the block solution, 1:200 sperm marker mouse α -sp56 and 1: 500 oocyte marker rabbit α -RME-2. Primary antibodies were removed and gonads were washed 3x 10 minutes in PBST. 100 µL of block containing DAPI (1 µg/mL), α -mouse alexa647 and α -rabbit alexa555 secondary antibody (1:1000 each) was added and gonads incubated in the dark, rotating for 2 hours at RT. Gonads were washed 3x 10 minutes in PBST in the dark at RT. Gonads were mounted in 18 µL Prolong Glass antifade (ThermoFisher, P36984) and sealed with VALAP. Samples were kept at -20 °C until imaged.

MPK-1 staining: Hermaphrodites were staged, anesthetized and dissected as described for sperm/oocyte staining. Gonads were fixed in 2% paraformaldehyde (PFA) in 100 nM pH 7.2 K₂PO₄ for 30 minutes, rocking at RT. Gonads were washed 2x in PBST: first wash quick and second wash for 5 minutes at RT. Gonads were fixed in methanol for 30 minutes at -20 °C. Gonads were washed 2x, following the same procedure as after the PFA fix. Gonads were blocked for 1 hour, rocking at RT. Primary antibodies—mouse α -V5 (Bio-Rad), rat α -OLLAS (Novis, NBP1-06713), rabbit α -ERK (Santa Cruz Biotechnology, Sc94)—were diluted 1:1000, 1:200, 1:1000 in blocking solution,

respectively. Gonads incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. Gonads were then washed 2x PBST quickly and 2x PBST for 10 minutes. Secondary α -mouse alexa555, α -rat alexa647, and α -rabbit alexa488 antibodies, and DAPI (1 μ g/mL) were all diluted 1:1000 in block solution and incubated for 2 hours, rocking in the dark at RT. Secondary antibodies were removed and gonads were washed 4x in PBST—2x quickly and 2x for 10 minutes in the dark. Gonads were mounted in 18 μ L Prolong Glass antifade, sealed with VALAP, and stored at -20 °C until imaged.

DAPI staining: Staged L4+24 hr hermaphrodites were dissected in PBST+0.25 μ M levamisole. Gonads were collected and fixed in 2% pFA for 10 minutes, rocking at RT. The fixation solution was removed; samples were washed once with PBST. The gonads were permeabilized in PBST+0.5%BSA+0.1%Triton-X for 10 minutes, rocking at RT. The permeabilization solution was removed and gonads were incubated with DAPI (1 μ g/mL) in PBST for 30 minutes, rocking in the dark at RT. Gonads were washed 3x in PBST for 10 minutes in the dark at RT. After the washes, gonads were mounted in 10 μ L Vectashield (Vector laboratories) and sealed with VALAP. Samples were kept at 4 °C until imaged.

Image acquisition

For Figs. 2-3, Fig. S3, all images were taken using a Leica SP8 confocal microscope using a 40x oil objective (NA 1.3) with 1.5 zoom and 0.30 μ m z-step. For fluorescence quantification (Fig. S3E-G), images of the distal gonad were taken first (progenitor zone through mid-pachytene region). Fluorophores alexa 488, alexa 555, alexa 647, and DAPI were excited at 488 nm, 561 nm, 633 nm, and 105 nm respectively; emissions were collected at 510-540 nm, 562-600 nm, 650-700 nm, and 425-490 nm, respectively.

The mosaic merge function of the Leica Lightening software package was used to generate Figs. 2-3 images. For all tile scanned germlines, a custom region of interest was drawn around the tissue; images were taken using a 1024x1024 window. All tiles covering the entire germline tissue were merged into one image during acquisition using default

settings. We did not quantify fluorescence of the mosaic merged images because the fluorescence intensity was smoothed at tile junction points.

For Figs. 3-4, differential interference contrast (DIC) and epifluorescence images were acquired every micron using a Plan-Apochromat 20x dry objective (NA 0.8) mounted on an inverted Zeiss Axio Observer.Z1. Images were stitched and deconvolved using the Zen software, and straightened using ImageJ. Epifluorescence signals were overlaid to the DIC images using Photoshop CS6.

Gonad volume quantification and germ cell counts

DAPI stained mosaic-merged gonads were imported into Imaris (version 9.3.1) using the software's file converter version 9.5. Using the surfaces function, outlines of the gonads were manually drawn around every other z plane throughout the stack. Afterwards, the "create surface" tool made a volume representation based on the manually drawn outlines. Then the volume was calculated in the detailed statistics tab in the surfaces menu. The same images were used to calculate both gonad volume and germ cell numbers. Using the multipoint tool in FIJI, germ cells were manually counted from the distal end to the loop.

MPK-1 protein quantification

Fluorescence intensity was measured in FIJI using previously described methods^{24, 72}. OLLAS and V5 intensities were normalized to the N2 background. ERK intensity was normalized to the *mpk-1b(Δ)* background because *mpk-1b* was previously shown to be the main germline isoform¹⁹. Intensity plots were generated by importing FIJI data into MATLAB using the `shadedErrorBar` function (Rob Campbell, www.GitHub.com, 2020).

***E. coli* attraction**

Animals were raised at 25°C until the late L4 stage and picked, in cohorts of 20-30 individuals, to the center of a 6mm NGM dish, pre-seeded with a 40 uL drop of *E. coli* (OP50) overnight culture. Plates were imaged every half-hour during hours 22-24 post-L4 (until A1). The percentage of worms on food were counted at each time

point and averaged over all time points for each plate. This assay was repeated at least 4 times for each genotype.

Body length measurements

Animals were raised at 25 °C until they reached A1, paralysed with tetramizole in M9 buffer, and mounted on a 3% agarose pad. Whole animals were acquired using a 10X objective and measured using ImageJ.

Statistics

For parametric datasets, the one-way ANOVA was used, and followed by Tukey multiple comparisons. For non-parametric datasets, the Kruskal-Wallis test was used, and followed by Dunn multiple comparisons, adjusted according to the family-wide error rate procedure of Holm, and then by the false discovery rate procedure of Benjamini-Hochberg.

References

1. Davoli, T. *et al.* Cumulative haploinsufficiency and triplosensitivity drive aneuploidy patterns and shape the cancer genome. *Cell* **155**, 948-962 (2013).
2. Schneider, G., Schmidt-Supprian, M., Rad, R. & Saur, D. Tissue-specific tumorigenesis: context matters. *Nat Rev Cancer* **17**, 239-253 (2017).
3. Shain, A.H. *et al.* Genomic and Transcriptomic Analysis Reveals Incremental Disruption of Key Signaling Pathways during Melanoma Evolution. *Cancer Cell* **34**, 45-55 e44 (2018).
4. Burotto, M., Chiou, V.L., Lee, J.M. & Kohn, E.C. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer* **120**, 3446-3456 (2014).
5. Meng, D., Frank, A.R. & Jewell, J.L. mTOR signaling in stem and progenitor cells. *Development* **145** (2018).
6. Shaul, Y.D. & Seger, R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1213-1226 (2007).
7. Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J. & Smith, A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* **210**, 30-43 (1999).
8. Lu, C.W. *et al.* Ras-MAPK signaling promotes trophectoderm formation from embryonic stem cells and mouse embryos. *Nat Genet* **40**, 921-926 (2008).
9. Tee, W.W., Shen, S.S., Oksuz, O., Narendra, V. & Reinberg, D. Erk1/2 activity promotes chromatin features and RNAPII phosphorylation at developmental promoters in mouse ESCs. *Cell* **156**, 678-690 (2014).
10. Ying, Q.L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519-523 (2008).
11. Chen, H. *et al.* Erk signaling is indispensable for genomic stability and self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E5936-5943 (2015).
12. Goke, J., Chan, Y.S., Yan, J., Vingron, M. & Ng, H.H. Genome-wide kinase-chromatin interactions reveal the regulatory network of ERK signaling in human embryonic stem cells. *Mol Cell* **50**, 844-855 (2013).
13. Thomson, J.A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147 (1998).
14. Sundaram, M.V. Canonical RTK-Ras-ERK signaling and related alternative pathways. *WormBook*, 1-38 (2013).
15. Lackner, M.R. & Kim, S.K. Genetic analysis of the *Caenorhabditis elegans* MAP kinase gene *mpk-1*. *Genetics* **150**, 103-117 (1998).

16. Lackner, M.R., Kornfeld, K., Miller, L.M., Horvitz, H.R. & Kim, S.K. A MAP kinase homolog, mpk-1, is involved in ras-mediated induction of vulval cell fates in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* **8**, 160-173 (1994).
17. Church, D.L., Guan, K.L. & Lambie, E.J. 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 (1995).
18. Lee, M.H. *et al.* Multiple functions and dynamic activation of MPK-1 extracellular signal-regulated kinase signaling in *Caenorhabditis elegans* germline development. *Genetics* **177**, 2039-2062 (2007).
19. Lee, M.H. *et al.* Conserved regulation of MAP kinase expression by PUF RNA-binding proteins. *PLoS Genet* **3**, e233 (2007).
20. Narbonne, P., Maddox, P.S. & Labbe, J.C. DAF-18/PTEN signals through AAK-1/AMPK to inhibit MPK-1/MAPK in feedback control of germline stem cell proliferation. *PLoS Genet* **13**, e1006738 (2017).
21. Hubbard, E.J.A. & Schedl, T. Biology of the *Caenorhabditis elegans* Germline Stem Cell System. *Genetics* **213**, 1145-1188 (2019).
22. Lee, C., Sorensen, E.B., Lynch, T.R. & Kimble, J. C. *elegans* GLP-1/Notch activates transcription in a probability gradient across the germline stem cell pool. *Elife* **5** (2016).
23. Shin, H. *et al.* SYGL-1 and LST-1 link niche signaling to PUF RNA repression for stem cell maintenance in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* **13**, e1007121 (2017).
24. Haupt, K.A. *et al.* The molecular basis of LST-1 self-renewal activity and its control of stem cell pool size. *Development* **146** (2019).
25. Morrison, S.J. & Kimble, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**, 1068-1074 (2006).
26. Narbonne, P., Maddox, P.S. & Labbe, J.C. DAF-18/PTEN locally antagonizes insulin signalling to couple germline stem cell proliferation to oocyte needs in *C. elegans*. *Development* **142**, 4230-4241 (2015).
27. Crittenden, S.L., Leonhard, K.A., Byrd, D.T. & Kimble, J. Cellular analyses of the mitotic region in the *Caenorhabditis elegans* adult germ line. *Mol Biol Cell* **17**, 3051-3061 (2006).
28. Nadarajan, S., Govindan, J.A., McGovern, M., Hubbard, E.J. & Greenstein, D. MSP and GLP-1/Notch signaling coordinately regulate actomyosin-dependent cytoplasmic streaming and oocyte growth in *C. elegans*. *Development* **136**, 2223-2234 (2009).
29. Narbonne, P. & Roy, R. Regulation of germline stem cell proliferation downstream of nutrient sensing. *Cell Div* **1**, 29 (2006).

30. Drummond-Barbosa, D. & Spradling, A.C. Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. *Dev Biol* **231**, 265-278 (2001).
31. Hubbard, E.J. Insulin and germline proliferation in *Caenorhabditis elegans*. *Vitam Horm* **87**, 61-77 (2011).
32. LaFever, L. & Drummond-Barbosa, D. Direct control of germline stem cell division and cyst growth by neural insulin in *Drosophila*. *Science* **309**, 1071-1073 (2005).
33. Michaelson, D., Korta, D.Z., Capua, Y. & Hubbard, E.J. Insulin signaling promotes germline proliferation in *C. elegans*. *Development* **137**, 671-680 (2010).
34. Narbonne, P. & Roy, R. Inhibition of germline proliferation during *C. elegans* dauer development requires PTEN, LKB1 and AMPK signalling. *Development* **133**, 611-619 (2006).
35. Shim, J., Gururaja-Rao, S. & Banerjee, U. Nutritional regulation of stem and progenitor cells in *Drosophila*. *Development* **140**, 4647-4656 (2013).
36. Cinquin, A. *et al.* Intermittent Stem Cell Cycling Balances Self-Renewal and Senescence of the *C. elegans* Germ Line. *PLoS Genet* **12**, e1005985 (2016).
37. Morgan, D.E., Crittenden, S.L. & Kimble, J. The *C. elegans* adult male germline: stem cells and sexual dimorphism. *Dev Biol* **346**, 204-214 (2010).
38. Jiang, H. *et al.* Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut. *Cell* **137**, 1343-1355 (2009).
39. Mondal, B.C. *et al.* Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. *Cell* **147**, 1589-1600 (2011).
40. Hsu, Y.C., Li, L. & Fuchs, E. Transit-amplifying cells orchestrate stem cell activity and tissue regeneration. *Cell* **157**, 935-949 (2014).
41. Miller, M.A. *et al.* A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation. *Science* **291**, 2144-2147 (2001).
42. de la Cova, C., Townley, R., Regot, S. & Greenwald, I. A Real-Time Biosensor for ERK Activity Reveals Signaling Dynamics during *C. elegans* Cell Fate Specification. *Dev Cell* **42**, 542-553 e544 (2017).
43. Morgan, C.T., Noble, D. & Kimble, J. Mitosis-meiosis and sperm-oocyte fate decisions are separable regulatory events. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 3411-3416 (2013).
44. Clandinin, T.R., DeModena, J.A. & Sternberg, P.W. Inositol trisphosphate mediates a RAS-independent response to LET-23 receptor tyrosine kinase activation in *C. elegans*. *Cell* **92**, 523-533 (1998).
45. Paix, A., Folkmann, A., Rasoloson, D. & Seydoux, G. High Efficiency, Homology-Directed Genome Editing in *Caenorhabditis elegans* Using CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Complexes. *Genetics* **201**, 47-54 (2015).

46. Dickinson, D.J., Ward, J.D., Reiner, D.J. & Goldstein, B. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat Methods* **10**, 1028-1034 (2013).
47. Frokjaer-Jensen, C. *et al.* Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* **40**, 1375-1383 (2008).
48. Mello, C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D. & Ambros, V. Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* **10**, 3959-3970 (1991).
49. Kelly, W.G. & Fire, A. Chromatin silencing and the maintenance of a functional germline in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **125**, 2451-2456 (1998).
50. Gu, T., Orita, S. & Han, M. *Caenorhabditis elegans* SUR-5, a novel but conserved protein, negatively regulates LET-60 Ras activity during vulval induction. *Mol Cell Biol* **18**, 4556-4564 (1998).
51. Stefanakis, N., Carrera, I. & Hobert, O. Regulatory Logic of Pan-Neuronal Gene Expression in *C. elegans*. *Neuron* **87**, 733-750 (2015).
52. Gilleard, J.S., Barry, J.D. & Johnstone, I.L. cis regulatory requirements for hypodermal cell-specific expression of the *Caenorhabditis elegans* cuticle collagen gene *dpy-7*. *Mol Cell Biol* **17**, 2301-2311 (1997).
53. Sommermann, E.M., Strohmaier, K.R., Maduro, M.F. & Rothman, J.H. Endoderm development in *Caenorhabditis elegans*: the synergistic action of ELT-2 and -7 mediates the specification-->differentiation transition. *Dev Biol* **347**, 154-166 (2010).
54. Ahnn, J. & Fire, A. A screen for genetic loci required for body-wall muscle development during embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **137**, 483-498 (1994).
55. Tenen, C.C. & Greenwald, I. Cell Non-autonomous Function of *daf-18/PTEN* in the Somatic Gonad Coordinates Somatic Gonad and Germline Development in *C. elegans* Dauer Larvae. *Curr Biol* **29**, 1064-1072 e1068 (2019).
56. Eisenmann, D.M. & Kim, S.K. Mechanism of activation of the *Caenorhabditis elegans* ras homologue *let-60* by a novel, temperature-sensitive, gain-of-function mutation. *Genetics* **146**, 553-565 (1997).
57. Starich, T.A., Hall, D.H. & Greenstein, D. Two classes of gap junction channels mediate soma-germline interactions essential for germline proliferation and gametogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **198**, 1127-1153 (2014).
58. Chi, C. *et al.* Nucleotide levels regulate germline proliferation through modulating GLP-1/Notch signaling in *C. elegans*. *Genes Dev* **30**, 307-320 (2016).
59. Lastwika, K.J., Dunn, C.A., Solan, J.L. & Lampe, P.D. Phosphorylation of connexin 43 at MAPK, PKC or CK1 sites each distinctly alter the kinetics of epidermal wound repair. *J Cell Sci* **132** (2019).

60. Solan, J.L. & Lampe, P.D. Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Lett* **588**, 1423-1429 (2014).
61. Zhang, P. *et al.* An SH3PX1-Dependent Endocytosis-Autophagy Network Restrains Intestinal Stem Cell Proliferation by Counteracting EGFR-ERK Signaling. *Dev Cell* **49**, 574-589 e575 (2019).
62. Tan, B.T., Park, C.Y., Ailles, L.E. & Weissman, I.L. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab Invest* **86**, 1203-1207 (2006).
63. Scott, J.G. *et al.* Recasting the cancer stem cell hypothesis: unification using a continuum model of microenvironmental forces. *Curr Stem Cell Rep* **5** (2019).
64. Tomasetti, C. *et al.* Role of stem-cell divisions in cancer risk. *Nature* **548**, E13-E14 (2017).
65. Tomasetti, C., Li, L. & Vogelstein, B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* **355**, 1330-1334 (2017).
66. Tomasetti, C. & Vogelstein, B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* **347**, 78-81 (2015).
67. Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94 (1974).
68. Seydoux, G., Savage, C. & Greenwald, I. Isolation and characterization of mutations causing abnormal eversion of the vulva in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **157**, 423-436 (1993).
69. Gibson, D.G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **6**, 343-345 (2009).
70. Dokshin, G.A., Ghanta, K.S., Piscopo, K.M. & Mello, C.C. Robust Genome Editing with Short Single-Stranded and Long, Partially Single-Stranded DNA Donors in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **210**, 781-787 (2018).
71. Paix, A. *et al.* Scalable and versatile genome editing using linear DNAs with microhomology to Cas9 Sites in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **198**, 1347-1356 (2014).
72. Crittenden, S.L. *et al.* Sexual dimorphism of niche architecture and regulation of the *Caenorhabditis elegans* germline stem cell pool. *Mol Biol Cell* **30**, 1757-1769 (2019).
73. Dernburg, A.F., Zalevsky, J., Colaiacovo, M.P. & Villeneuve, A.M. Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line. *Genes Dev* **14**, 1578-1583 (2000).
74. Yochem, J., Gu, T. & Han, M. A new marker for mosaic analysis in *Caenorhabditis elegans* indicates a fusion between *hyp6* and *hyp7*, two major components of the hypodermis. *Genetics* **149**, 1323-1334 (1998).

75. Masse, I., Molin, L., Billaud, M. & Solari, F. Lifespan and dauer regulation by tissue-specific activities of *Caenorhabditis elegans* DAF-18. *Dev Biol* **286**, 91-101 (2005).
76. Narbonne, P. & Roy, R. *Caenorhabditis elegans* dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival. *Nature* **457**, 210-214 (2009).

Acknowledgements

We thank Shaolin Li for sharing reagents and precious advice, Claire de la Cova, Iva Greenwald and Alex Hajnal for sharing strains, Jean-Claude Labbé and Geneviève Pépin for critically reading the manuscript, and Wormbase for making our lives easier. This work was funded by grants from the UQTR Foundation, the Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologies (2018-NC-205752), the Fonds de Recherche du Québec – Santé (#265445), the Canada Natural Science and Engineering Research Council (RGPIN-2019-06863, RGPAS-2019-00017, DGEGR-2019-00326), the Canadian Institutes for Health Research (PJT - 169138), and the Canada Foundation for Innovation (#36916) to PN. PN is a Junior 1 Bursary Scholar (#252405) of the Fonds de Recherche du Québec – Santé and holds a UQTR research chair. SR-T was supported by the National Science Foundation Graduate Research Fellowship under grant No. (DGE-1256259) and the NIH Predoctoral training grant in Genetics 5T32GM007133. JK was an HHMI Investigator and is now supported by NIH R01 GM134119. Any opinion, findings, and conclusions or recommendations expressed in this material are those of the authors(s) and do not necessarily reflect the views of the National Science Foundation. Some strains were provided by the CGC, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440).

Author contribution

BD: Figures 1A-D, S1-2, with guidance by PN.

SR-T: Figures 2-3, S3 and Tables S1, S6, including the generation of all related strains, with guidance by JK and PN. Participated in study design, manuscript drafting and editing.

POM: pPOM5-9 construction, Figures 6, S4 and Table S2 with guidance by PN.

XL: pXA2 construction, with guidance by PN.

AADB: Figure 1E (*fog-1*, *let-60gf*), with guidance by PN.

VR: Figure 1E (*lin-3*) and Figure 7 drawing, with guidance by PN.

YC: Helped POM with some aspects of Figures 6 and Table S2, including with data analysis.

JK: Manuscript drafting and editing.

PN: Figures 3, 4 (with significant help from POM for 4A-I), Tables S2-5, in addition to generating some strains for Figure 1, general study design, plasmid design, and initial manuscript drafting.

All authors commented on the manuscript and approved its final version.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Materials & Correspondence

Correspondence and material requests should be addressed to:

Figures

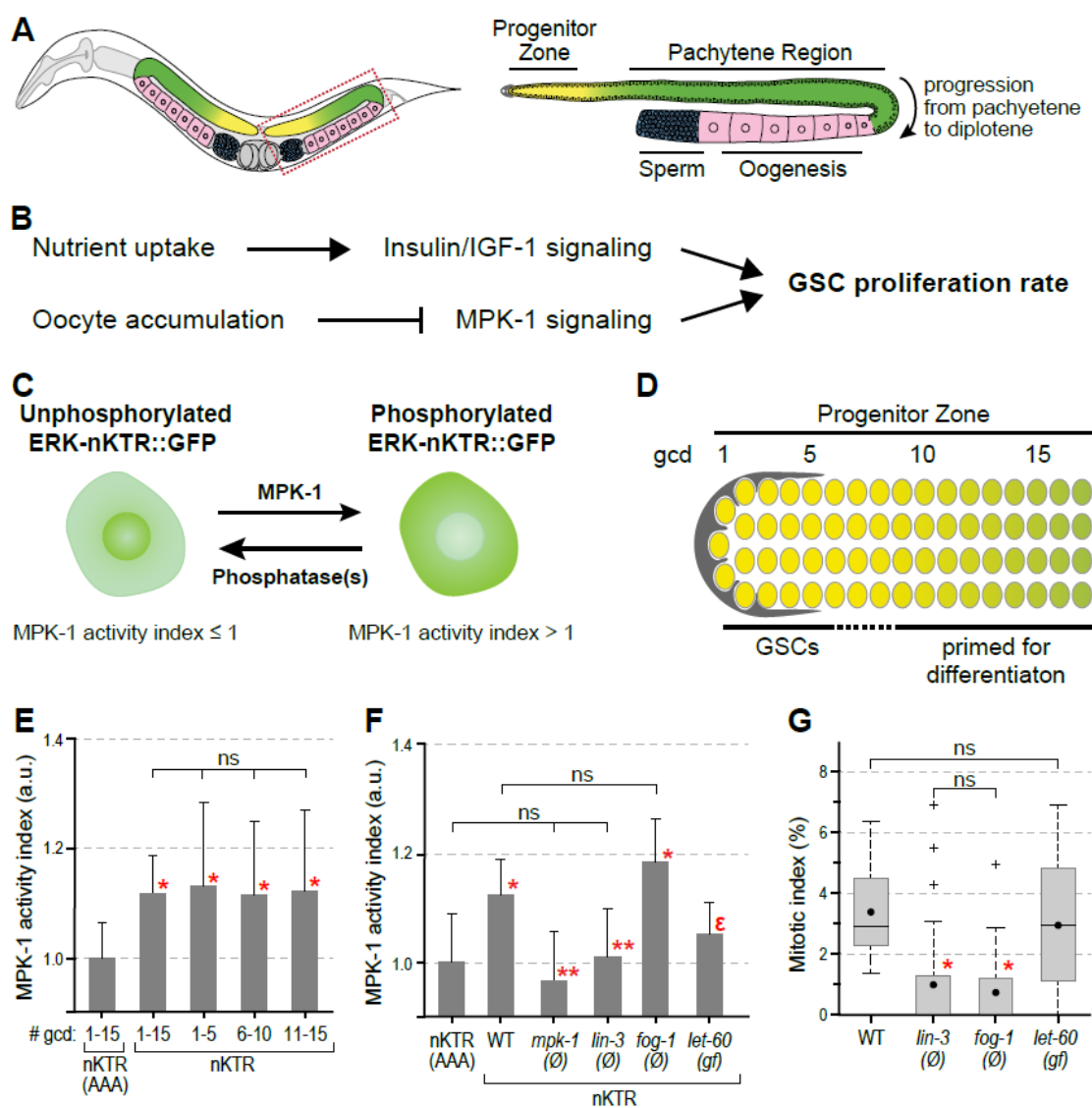


Figure 1. GSC MPK-1 activity does not correspond with GSC proliferation.

(A) Left, schematic of an adult *C. elegans* hermaphrodite with posterior gonadal arm boxed; right, gonadal arm labelled with regions relevant to this work. (B) GSC proliferation rate is regulated by both Insulin/IGF-1 signaling and MPK-1 signaling, which act in parallel with additive effects (Narbonne et al., 2017). (C) Schematic of *in vivo* assay for MPK-1 activity. Sensor GFP is enriched in the nucleus when MPK-1 activity is absent (left), but becomes cytoplasmic upon phosphorylation by MPK-1/ERK (right). The MPK-1 index refers to the ratio of cytoplasmic to nuclear GFP, normalized to the

ERK-nKTR(AAA) baseline control. An index > 1 indicates MPK-1 kinase activity. **(D)** Proliferating germ cells in the PZ include a pool of GSCs within the niche (grey) and GSC daughters that have launched the differentiation program but not yet begun overt differentiation. Numbers mark positions along the germline axis in germ cell diameters (gcd) from the distal end. **(E)** MPK-1 activity is significant and similar across the PZ. Sample sizes are 25 animals each for nKTR and nKTR(AAA), scoring 5 PZ cells per animal (see methods). **(F)** MPK-1 activity is lost from the PZ in *mpk-1(∅)*, *lin-3(∅)* and *let-60(gf)*, but not *fog-1(∅)* mutants. For simplicity, nKTR(AAA) data are shown only for wild-type (WT) (see Fig. S1 for all raw ratios). (E-F) Error bars, standard deviation. Red asterisk, statistical significance of ERK-nKTR compared to baseline ERK-nKTR(AAA) control ($p < 0.01$); determined by ANOVA followed by Tukey; ns, not significant; double asterisks, statistical significance vs the WT nKTR; ε, not different from both nKTR(AAA) and nKTR controls. Sample sizes, for each (nKTR(AAA); nKTR) pair, are WT (25, 25), *mpk-1(∅)* (10, 10), *lin-3(∅)* (7, 10), *fog-1(∅)* (11, 12), *let-60gf* (10, 10), scoring 5 PZ cells per animal. **(G)** Box plots of mitotic indices in WT and mutant PZs. Dots mark averages. Red asterisk, statistical significance compared to WT ($p < 0.01$; Kruskal-Wallis followed by Dunn). Sample sizes, from left to right, are 14, 39, 17, 19.

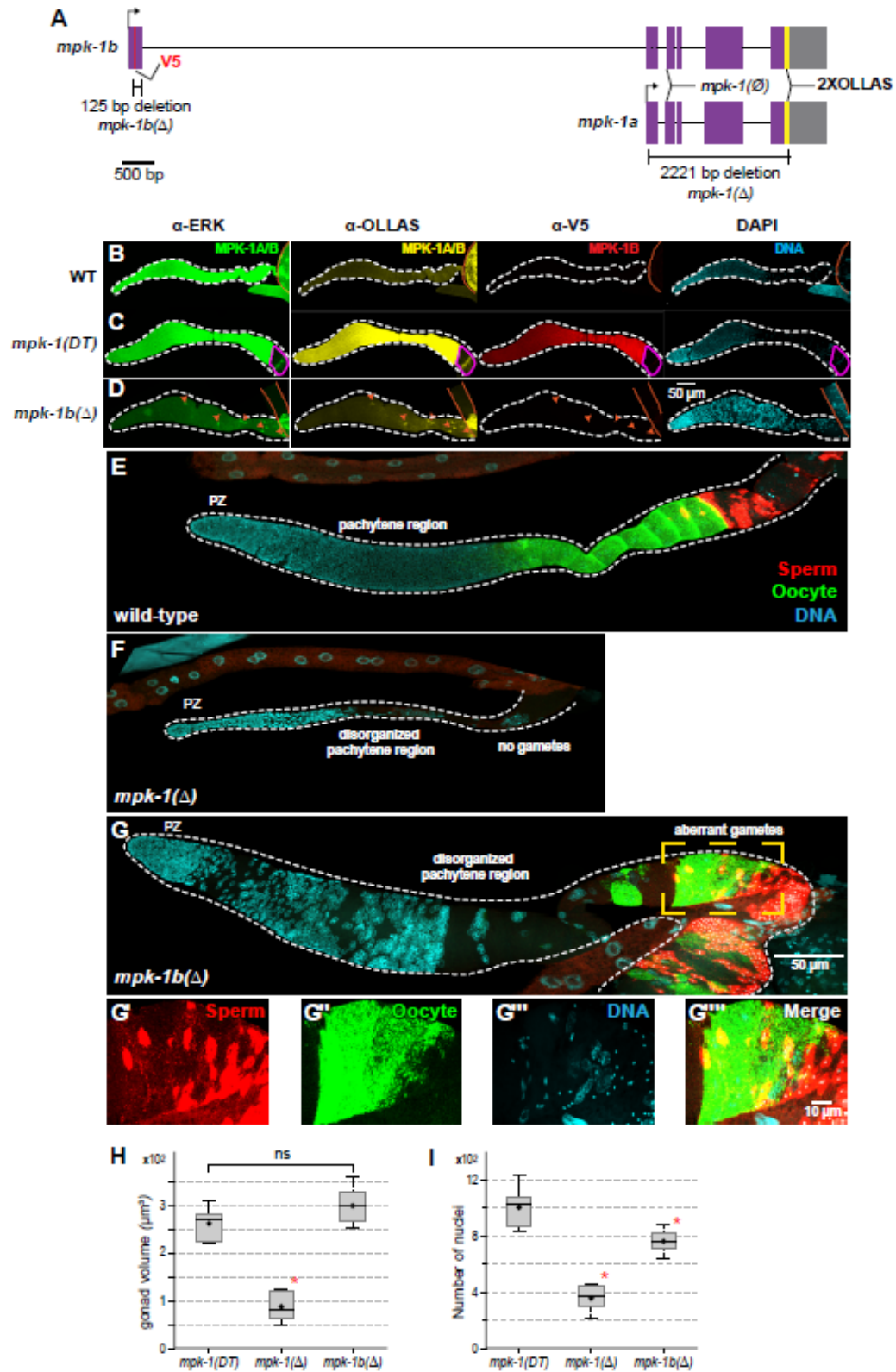


Figure 2. MPK-1B is germline-specific and promotes germline differentiation.

(A) The two *mpk-1* isoforms. Purple boxes, coding exons; gray boxes, UTRs; lines

connecting exons, introns; red line, V5 tag; yellow line, 2xOLLAS tags. Dual tagged *mpk-1(DT)* harbors a V5 tag in the *mpk-1b* specific exon that marks MPK-1B protein specifically, and C-terminal 2xOLLAS tags that mark both MPK-1A and B proteins. The *mpk-1b(Δ)* deletion removes most of the *mpk-1* specific exon and shifts the reading frame to eliminate MPK-1B. The *mpk-1(Δ)* deletion removes most of the shared exons and introns to eliminate MPK-1A and B (see Methods). The *mpk-1(gal117)* is considered a null (Lee et al., 2007b) and shown here as *mpk-1(∅)*. **(B-G)** Representative maximal projections of dissected and stained adult gonads. (B-D) Acquisition parameters were optimized for the PZ region (see Fig. S3E-G for quantification). When a stain does not distinguish between MPK-1A and MPK-1B, it is noted as MPK-1A/B. Anti-OLLAS staining, yellow; anti-V5 staining, red; anti-ERK staining, green; DAPI staining, cyan. White dashed line, boundaries of germline tissue; orange dashed line, boundaries of somatic tissue. Orange arrowheads, gonadal sheath nuclei. Pink outline, zygote. **(E-G)** Sperm and oocytes were stained with sp56 and RME-2 antibodies, respectively. Dashed yellow box, region magnified in D'-D'''''. **(D'-D''''')** Sperm and oocyte markers shown individually and merged. **(H-I)** Box plots of gonad volume and germ cell number for *mpk-1(DT)*, *mpk-1(Δ)*, and *mpk-1b(Δ)*. Gonad volume was calculated using Imaris (see Methods). Germ cells were counted manually using FIJI. Sample sizes are, from left to right, 10, 6, 7. Red asterisk, statistical significance vs all other samples ($p < 0.01$; ANOVA followed by Tukey); ns, not significant.

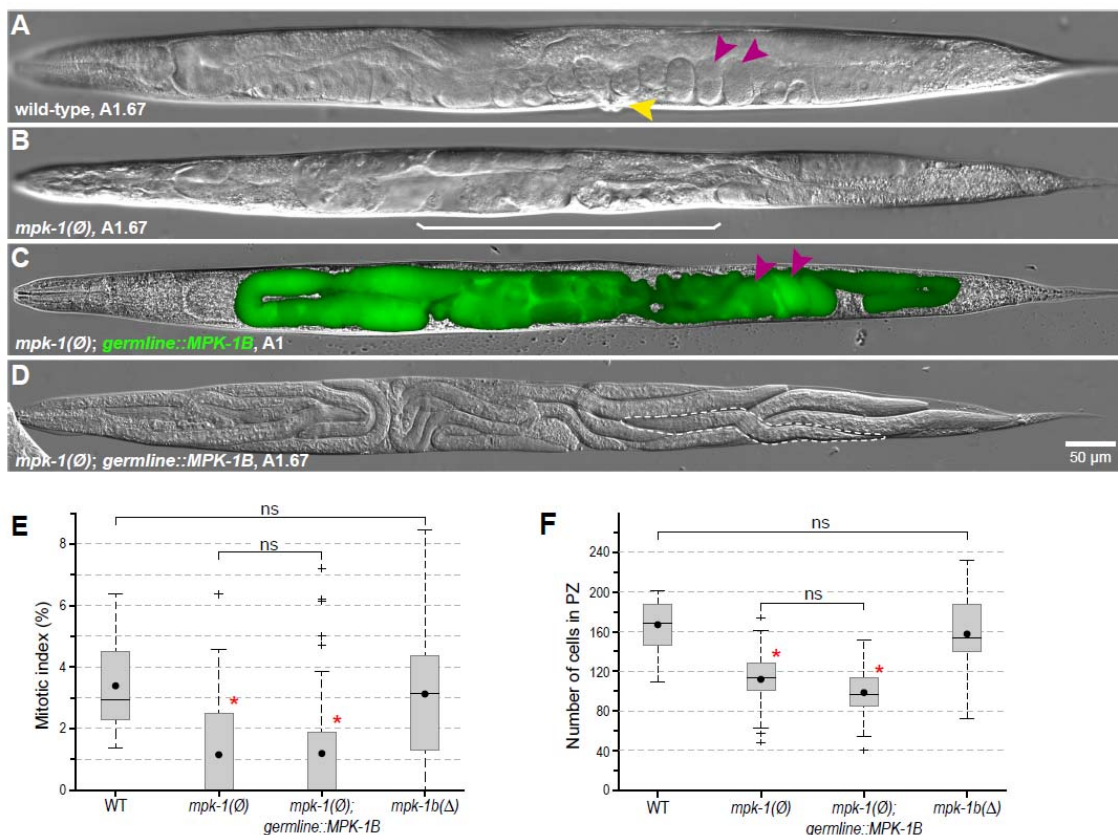


Figure 3. Germline MPK-1B does not promote GSC proliferation.

(A-D) Representative DIC images of adults of indicated genotypes (full genotypes in Table S4), at either 24 (A1) or 40 (A1.67) hours after the late L4 stage (25 °C). (A) Wild-type animals produce embryos (pink arrowheads) that are laid through their vulva (yellow arrowhead), while (B) *mpk-1(Δ)* mutants have no vulva, are sterile and have an empty uterus (bracket). (C) Germline-specific GFP::MPK-1B expression (green overlay) restores embryo generation in *mpk-1(Δ)* mutants. (D) Since vulva formation is not restored, these embryos however hatch inside their mother (a dotted line highlights a hatched larva). Anterior, left. (E-F) Box plots of the PZ MI and size in A1 hermaphrodites. Dots mark averages. Sample sizes are, from left to right, 14, 37, 39, 32. Red asterisk, statistical significance vs wild-type (WT) ($p < 0.01$; (E) Kruskal-Wallis followed by Dunn; (F) ANOVA followed by Tukey).

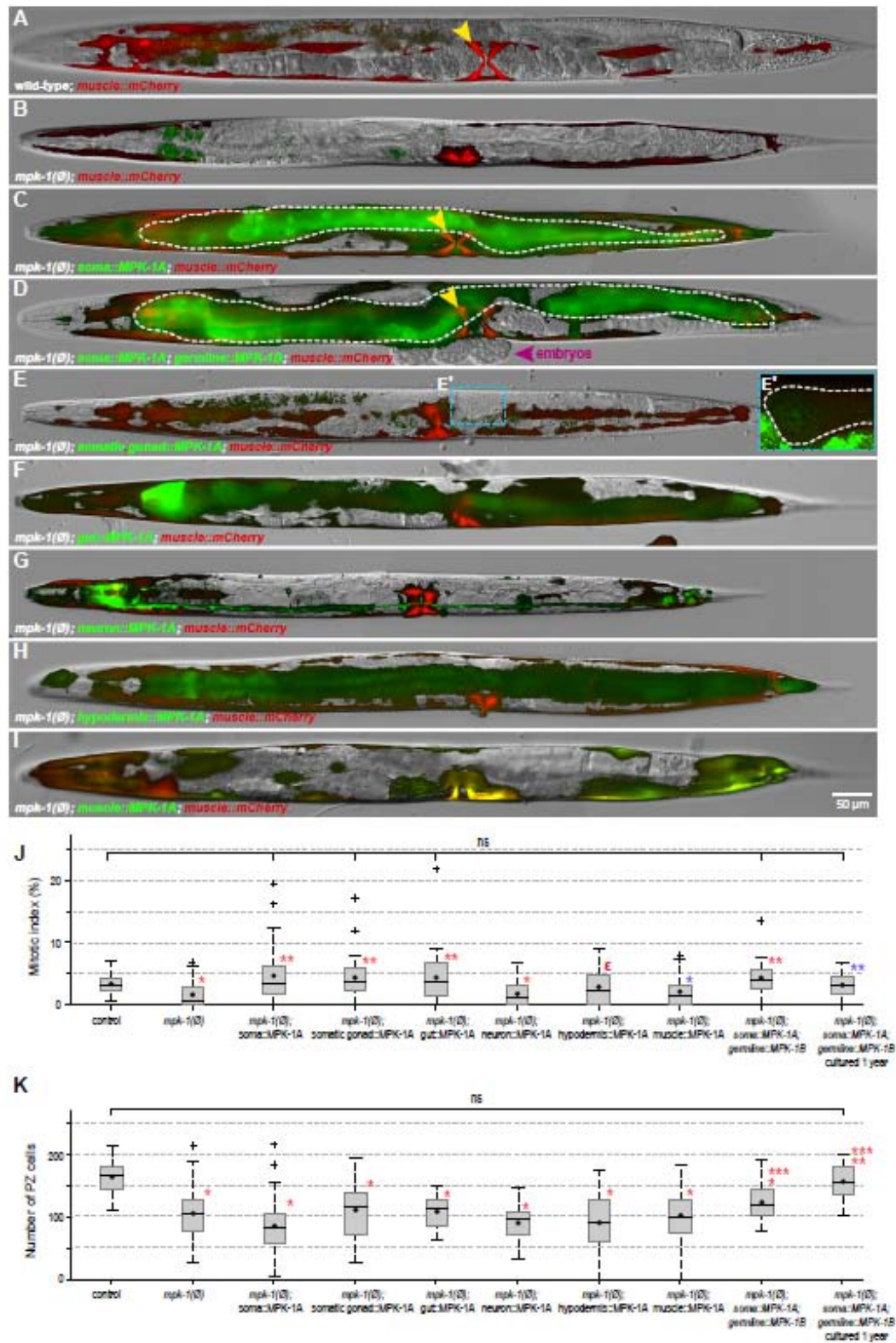


Figure 4. Somatic MPK-1A promotes GSC proliferation non-autonomously.

(A-I) Representative DIC images of A1 hermaphrodites of indicated genotypes (full

genotypes in Table S4), overlaid with fluorescence signals from GFP::MPK-1A and muscle::mCherry. All animals carry *Pmyo-3::mCherry* as an extrachromosomal array marker, and also to assess vulva muscle specification (yellow arrowheads mark properly specified vulva muscles). Anterior, left. Images were not all captured with the same settings, because GFP::MPK-1A levels varied from promoter to promoter, and the aim was to illustrate specificity and expression pattern. Dashed lines, gut expression in C-D; somatic gonad expression in E' (undetectable in adults; Tenen and Greenwald, 2019). Notes: For unknown reasons, animals in (D) appeared hypersensitive to tetramisole and laid embryos (pink arrowhead) upon paralysis. Also in these animals, GFP::MPK-1B (in the germline) was unusually low (compare to Fig. 3C), likely due to co-suppression (Dernburg et al., 2000). (J) Box plots of the PZ MI and of (K) PZ cell number in A1 hermaphrodites. Dots mark averages. For each genotype, data from two to three independent lines were pooled together, except for the control, where only one line was analysed. (J) Sample sizes are, for each genotype from left to right, 24, 39, 40, 34, 31, 39, 25, 42, 27, 21. Single asterisk, statistical significance vs control; double asterisks, vs *mpk-1(∅)*; ε, not different from both control and *mpk-1(∅)* (Red: $p < 0.01$, blue: $p < 0.05$; Kruskal-Wallis followed by Dunn). (K) Sample sizes are as in (J), except for *hypodermis::MPK-1A* and *muscle::MPK-1A*, which each had an additional sample with no PZ. Asterisks, as in (J), except using ANOVA, followed by Tukey; triple asterisks, statistical significance vs *mpk-1(∅)*; *soma::MPK-1A*.

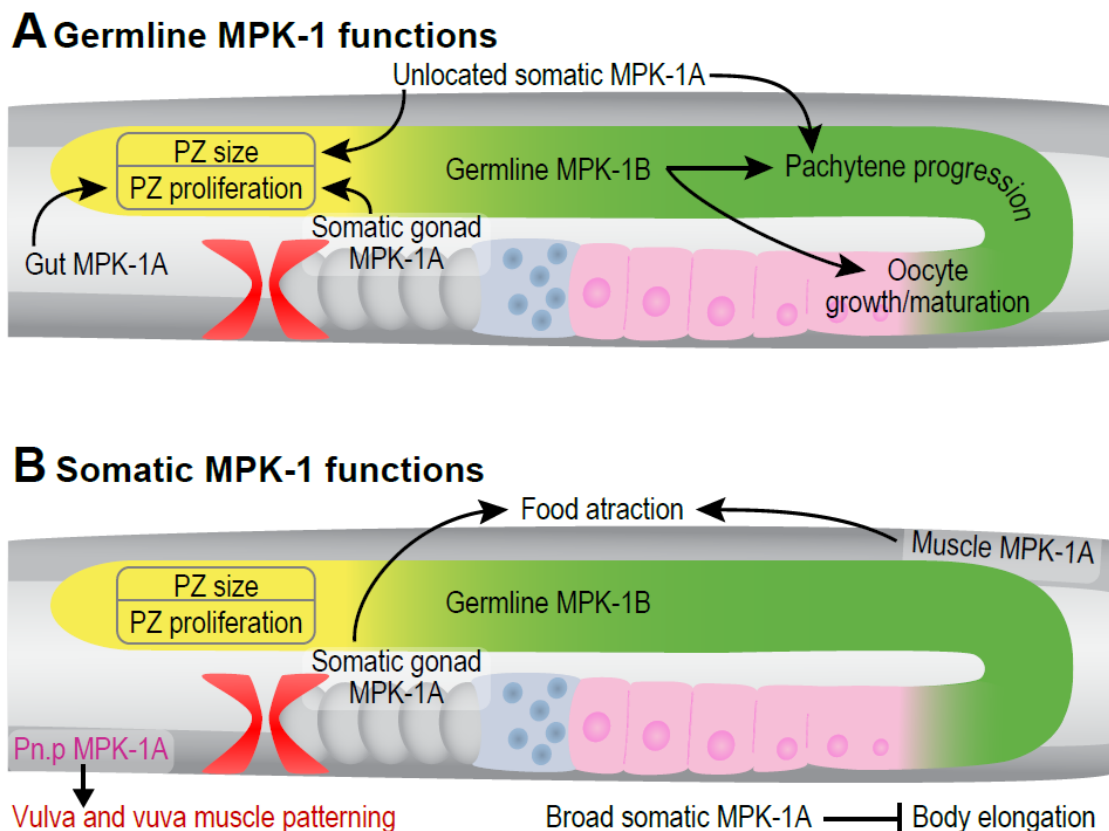


Figure 5. Models for cell autonomous and non-autonomous MPK-1 functions.

(A) MPK-1 affects the germline both autonomously and non-autonomously. Germline MPK-1B autonomously ensures proper meiotic progression and gametogenesis. Somatic MPK-1A, on the other hand, non-autonomously ensures proper PZ size and proliferation and some, albeit abnormal meiotic progression and gametogenesis. MPK-1A non-autonomously promotes GSC proliferation from the gut and somatic gonad, but its site of action for meiotic progression and gametogenesis remain unknown. (B) MPK-1 activity has multiple somatic functions. Somatic MPK-1A is thought to act autonomously in the vulva (Lackner et al., 1994). It further promotes food attraction non-autonomously from the somatic gonad and muscle and regulates body length from any somatic tissue except the gut. (A-B) Arrows represent stimulation, and bars, repression. Gut, light grey. Germline PZ, yellow. Differentiated germline, green. Vulva muscles, red. Body wall muscles, dark grey.

Supplementary material

Supplementary Figures

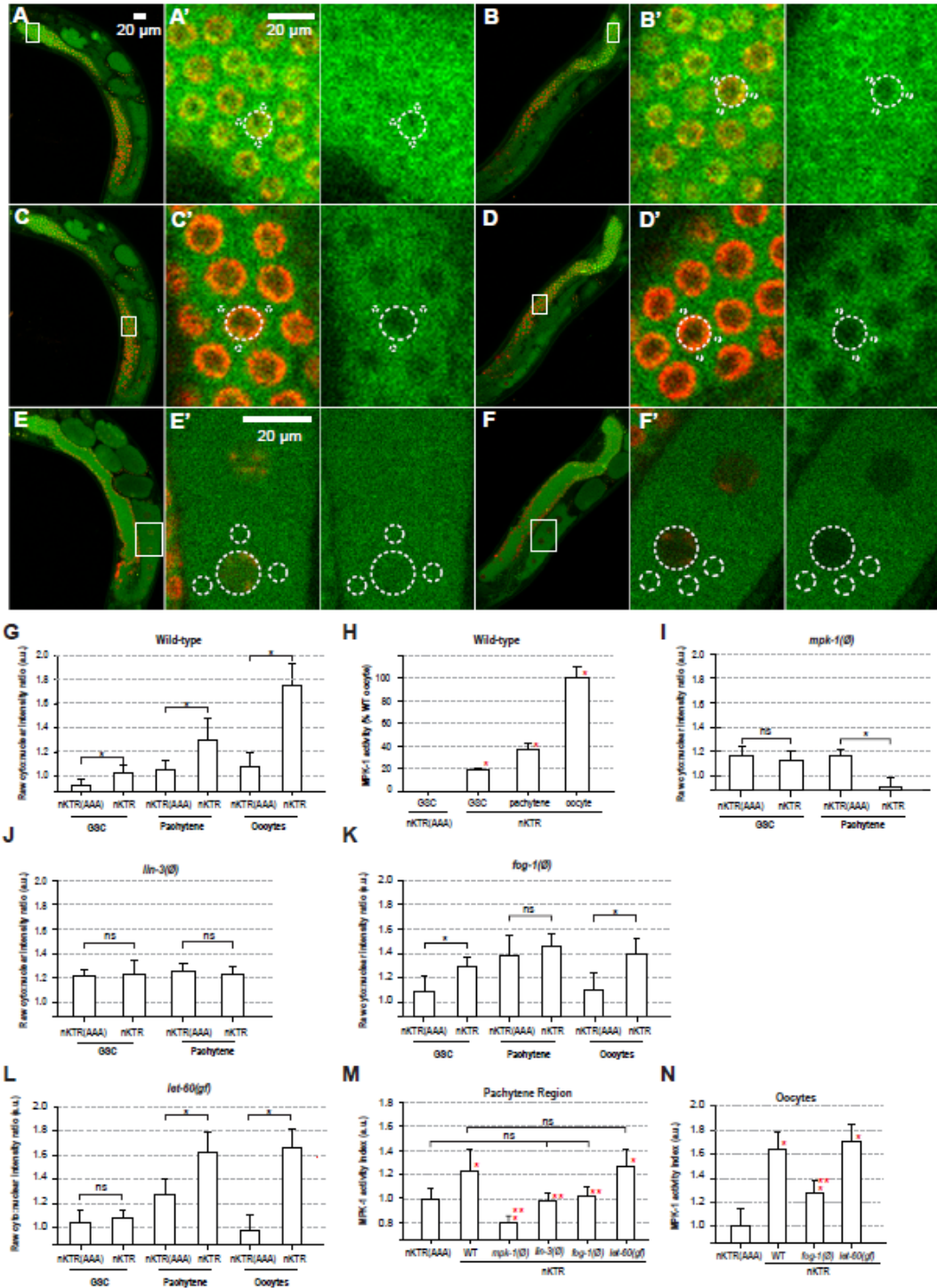


Figure S1. Germline ERK-nKTR analysis, Related to Figure 1. (A-F) Representative confocal images and (A'-F') closeups of the (A, C, E) ERK-nKTR(AAA)::GFP and

(B, D, F) ERKnKTR::GFP fluorescence signals in the (A-B) PZ, (C-D) pachytene, and (E-F) oocytes in an A1 hermaphrodite of a wild-type background. A different focal plane of the same animal is shown in (A, C, E) and (B, D, F). Red, *H2B::mCherry*; green (A, C, E) *ERK-nKTR(AAA)*; (B, D, F) *ERKnKTR*. A large dotted circle delineates one nucleus that is in focus for each zone. For each delineated nucleus, 3 smaller dotted circles were randomly placed (using the red channel only) around the nucleus for cytoplasmic green channel intensity sampling. (G, I-L) Raw cytoplasmic:nuclear GFP fluorescence intensity ratios for both *ERK-nKTR(AAA)* and *ERK-nKTR* in the PZ, pachytene and oocytes in (G) wild-type, (I) *mpk-1(ø)*, (J) *lin-3(ø)* (K) *fog-1(ø)*, and (L) *let-60(ga89)gf* backgrounds. Surprisingly, the raw nKTR ratio was significantly below the nKTR(AAA) control in *mpk-1(ø)* pachytene cells. Although these cells are highly abnormal (Fig. 2F) (Lee et al., 2007b), this unexpected result could potentially suggest a confounding factor. (H) Data from (G) transformed to represent MPK-1 activity as a percentage of MPK-1 activity in oocytes. (M) MPK-1 is similarly active in the pachytene region of control and *let-60(gf)* animals, but not in *mpk-1(ø)*, *fog-1(ø)* and *lin-3(ø)* mutants. (N) MPK-1 is similarly active in the oocytes of control and *let-60(gf)* animals, but is significantly lower in unfertilized oocytes of *fog-1(ø)* mutants. (G-N) Error bars, standard deviation. Sample sizes, as in Fig. 1 E-F. Black asterisks represent statistical significance in pairwise comparisons; single red asterisk, vs the *nKTR(AAA)* baseline control; two red asterisks, vs wild-type ($P < 0.01$; ANOVA followed by Tukey); ns, not significant.

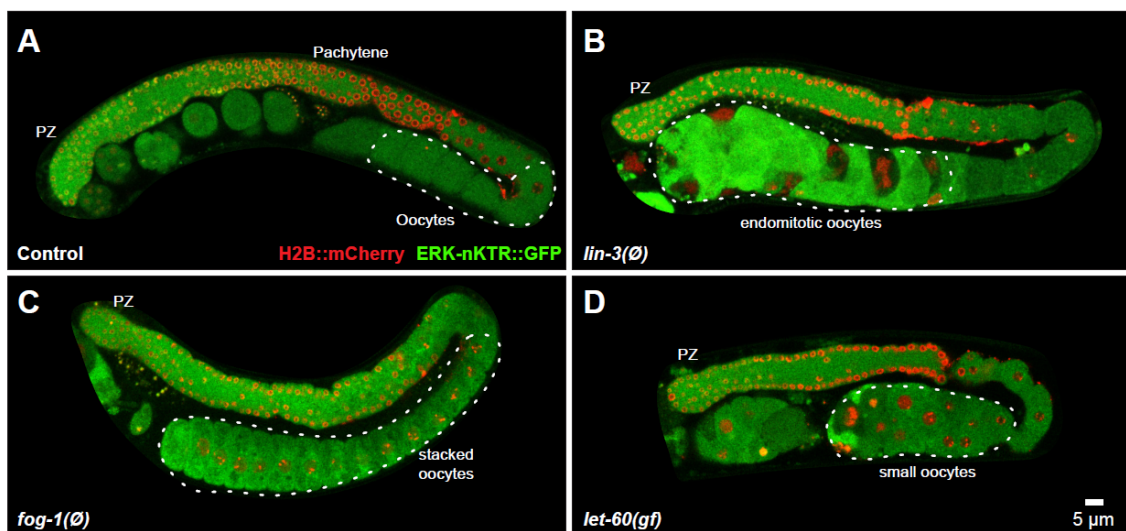
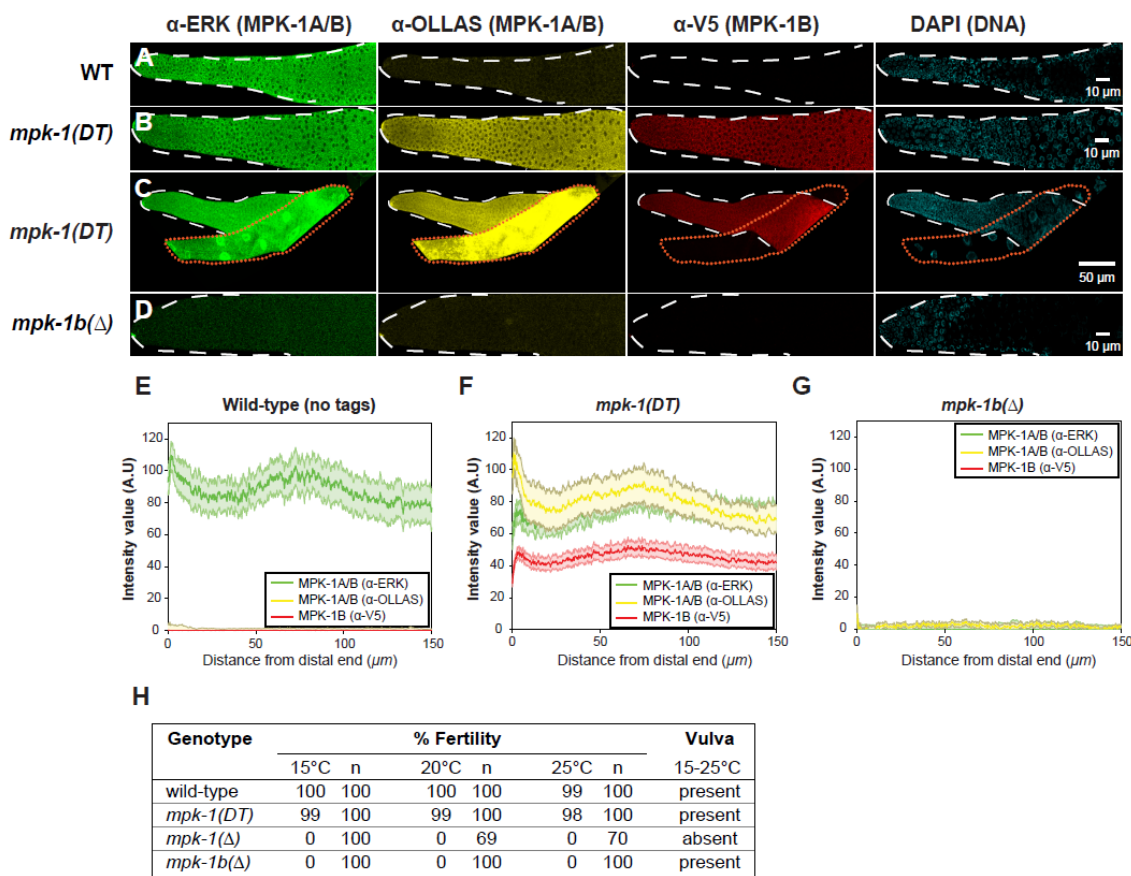


Figure S2. Germline phenotypes of selected mutants, Related to Figure 1. Representative confocal sections of A1 hermaphrodite gonads visualized with *arSi12[ERK-nKTR::GFP;mCherry::H2B]*. Non-germline tissues were masked to emphasize the germline. Dashed lines delineate the oocyte region. (A) Wild-type animal. Germline is normal. (B) *lin-3(ø)* mutant. Oocytes are endomitotic. (C) *fog-1(ø)* mutant. Arrested oocytes are stacked. (D) *let-60(gf)* mutant. Oocytes are smaller than normal and disorganized.



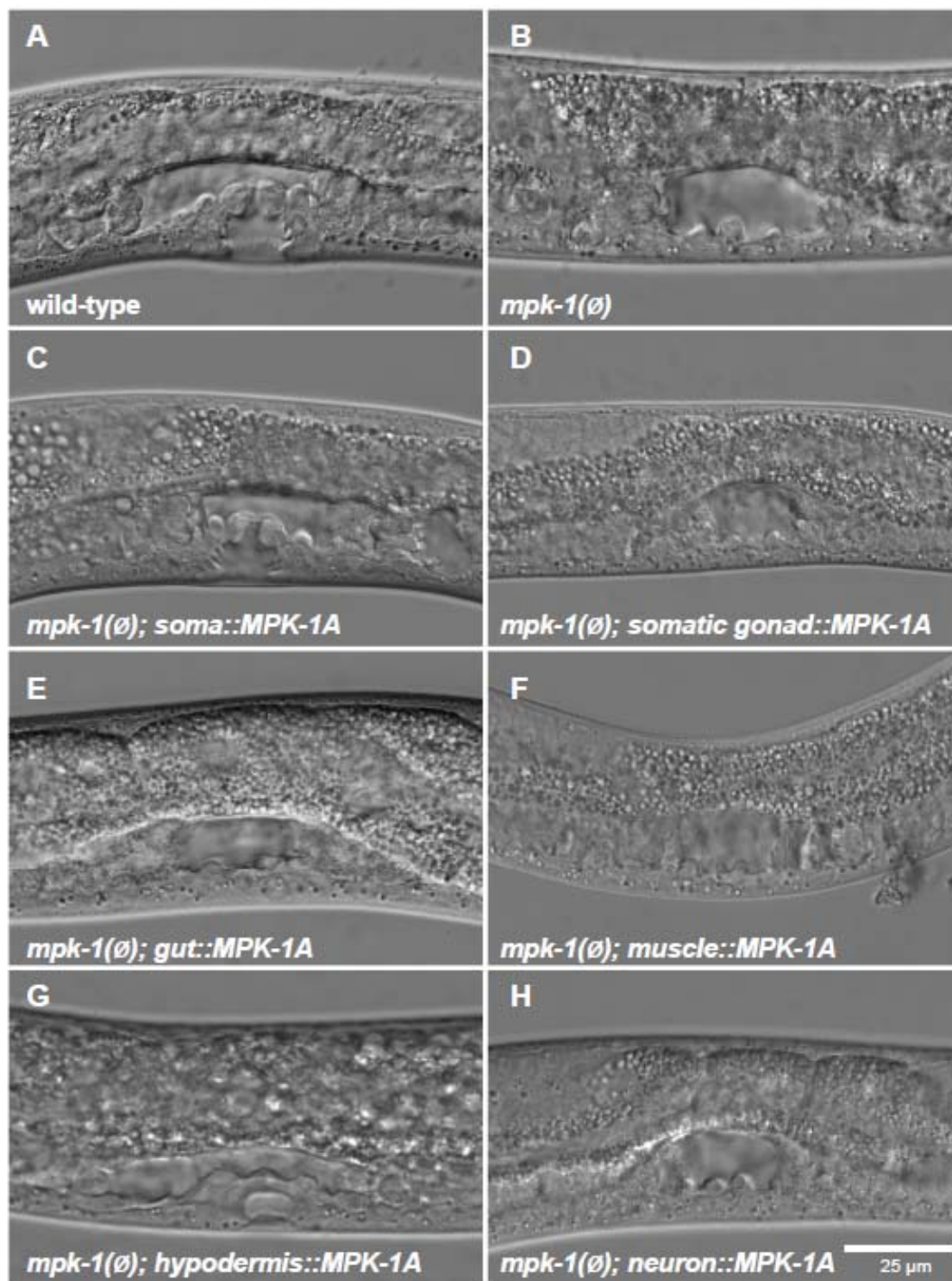


Figure S4. Vulva defects in *mpk-1* larvae and rescue by MPK-1A, Related to Figure 4. (A-H) Representative DIC images from L4 larvae of the indicated genotypes. Only *soma::MPK-1A* fully rescued vulva development. (G) We noticed that a small number of *hypodermis::MPK-1A* animals appeared to form a partial invagination (as in this example), resulting in a protruding vulva (Pvul) phenotype in the adult (see Fig. 4H).

This is likely due to leaky expression from the *Pdpy-7* promoter (reputed as Hyp 7-specific) into the Pn.p cells, which are also part of the hypodermal lineage.

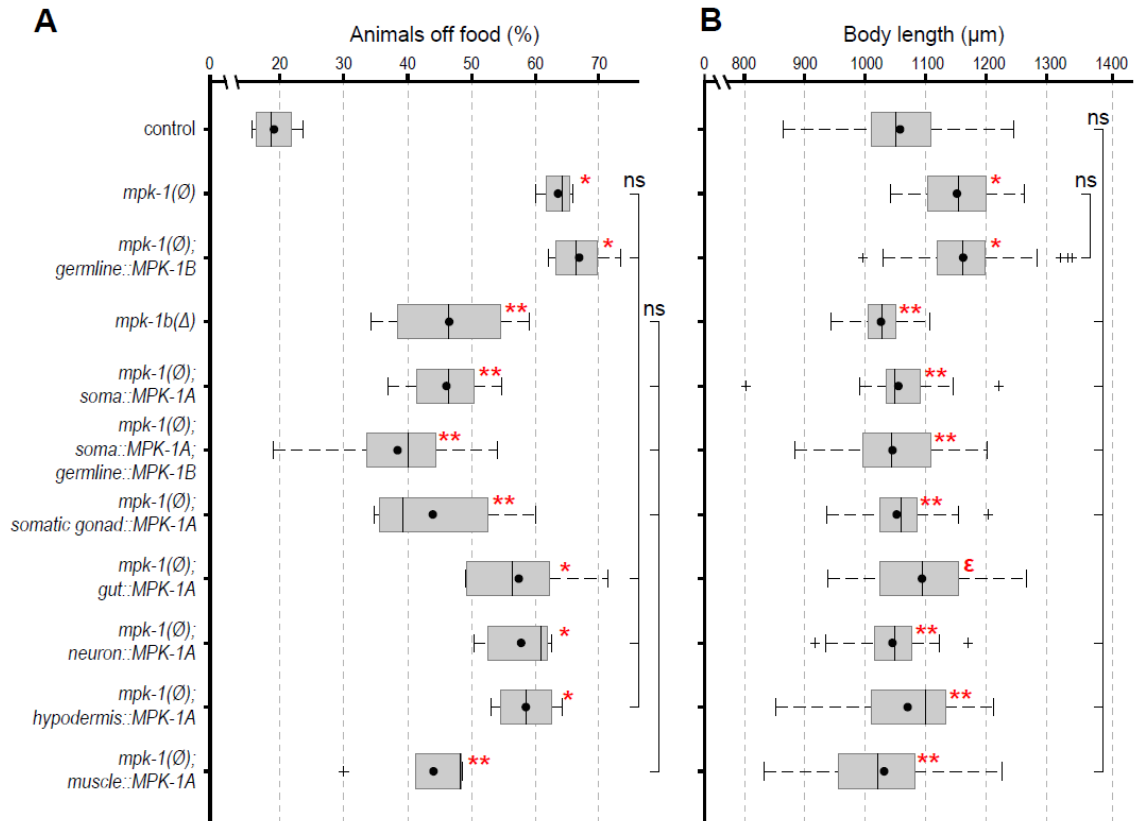


Figure S5. Regulation of food attraction and body length by somatic MPK-1A, Related to Figure 5. Box plots of (A) wandering behavior, measured as the percentage of animals found outside of the bacterial lawn and (B) body length in adult hermaphrodites of indicated genotypes (full genotypes in Table S4). (A-B) Red asterisk, statistical significance vs control; double asterisks, vs (A) both control and *mpk-1(0)*, or (B) vs *mpk-1(0)* ($p < 0.05$; ANOVA, followed by Tukey). e, not different from both control and *mpk-1(0)*. Sample sizes are, for each genotype from top to bottom, (A): 4, 4, 6, 4, 6, 7, 5, 6, 5, 4, 5, each with cohorts of 20-30 animals; (B): 107, 15, 106, 17, 19, 36, 15, 43, 15, 29, 40.

Supplementary Tables

Table S1. Frequency of germline defects in *mpk-1* mutants. Related to Figure 2.

Genotype	n	Sperm marker (% positive)	Oocyte marker (0% positive)	Pachytene region (0% normal)
Wild-type	23	100	100	100
<i>mpk-1b</i> (Δ)	23	78	43	0
<i>mpk-1b</i> (Δ)	22	0	0	0

Table S2. Vulva muscle features in *mpk-1*(\emptyset) mutants carrying tissue-specific transgenes. Related to Figure 4.

Genotype*	Sample size	Transgene lost from vulva muscles (%)	Normal vulva muscles ^f (%)	Abnormal vulva muscle shape (%)	Muv with abnormal vulva muscles (%)
Control	57	0	100	0	0
<i>mpk-1</i> (\emptyset)	64	9.4	0	90.6	0
<i>mpk-1</i> (\emptyset); <i>soma::MPK-1A</i>	130	6.2	49.2	40.8	3.8
<i>mpk-1</i> (\emptyset); <i>somatic gonad::MPK-1A</i>	84	11.9	0	86.9	1.2
<i>mpk-1</i> (\emptyset); <i>gut::MPK-1A</i>	94	8.5	0	91.5	0
<i>mpk-1</i> (\emptyset); <i>muscle::MPK-1A</i>	63	14.3	0	85.7	0
<i>mpk-1</i> (\emptyset); <i>hypodermis::MPK-1A</i>	47	6.4	0	93.6	0
<i>mpk-1</i> (\emptyset); <i>neuron::MPK-1A</i>	151	5.3	0	94.7	0
<i>mpk-1</i> (\emptyset); <i>5 tissues::MPK-1A</i> ^g	36	16.7	0	83.3	0

*, Except for the control, all animals are non-Rol mCherry⁺ progeny from parent of genotype *mpk1(gal117)/qC1[rol-6(gf); lag-2p::GFP]*. All were scored at A1 stage. All animals contain the *Pmyo-3::mCherry* extrachromosomal array, a marker of non-pharyngeal muscles, including vulva muscles. None of the transgenes rescued fertility.

^f, Vulva muscle formation is rescued by ubiquitous somatic MPK-1A expression, but not by expression in the somatic gonad, gut, hypodermis, neurons or muscles. These results are consistent with MPK-1A acting in epithelial Pn.p cells to specify vulva divisions autonomously (Lackner et al., 1994), and shape vulva muscles nonautonomously.

^g, Plasmids for somatic gonad, gut, muscle, hypodermis and neuron MPK-1A expression (*pPOM5-9*) were injected together at 20 ng/ μ l each.

Table S3. Rescue of *mpk-1(ø)* fertility. Related to Figure 4.

Genotype	Sample size	Average brood size ± standard deviation	Maximal brood size
Wild-type	10	281 ± 42	336
<i>mpk-1(ø)</i>	> 1000	0	0
<i>soma::MPK-1A</i>	130	0	0
<i>germline::MPK-1B</i>	20	12 ± 6	24
<i>soma::MPK-1A; germline::MPK-1B</i>	24	56 ± 24	108

Table S4. Strains, alleles, transgenes and rearrangements used in this work. Related to STAR Methods.

Name in text	Genotype	Strain name
wild-type	wild-type	N2
<i>ERK-nKTR</i>	<i>arSi12[mex-5p::ERK-KTR(NLS3)-gfp(smu-lintrons)-T2A-mCherry-his-11::tbb-2 3'UTR] I</i>	GS8729
<i>ERK-nKTR(AAA)</i>	<i>arSi15[mex-5p::ERK-KTR(NLS3, S43A, T55A, T62A)-gfp(smu-lintrons)-T2A-mCherry-his-11::tbb-2 3'UTR] I</i>	GS8752
<i>lin-3(ø)</i>	GFP- progeny of <i>lin-3(n1058)IV/nT1[qIs51]IV;V</i>	UTR5
<i>ERK-nKTR; lin-3(ø)</i>	GFP- progeny of <i>arSi12[mex-5p::ERK-KTR(NLS3)-gfp(smu-lintrons)-T2A-mCherry-his-11::tbb-2 3'UTR] I; lin-3(n1058)IV/nT1[qIs51]IV;V</i>	UTR12
<i>ERK-nKTR(AAA); lin-3(ø)</i>	GFP- progeny of <i>arSi15[mex-5p::ERK-KTR(NLS3, S43A, T55A, T62A)-gfp(smu-lintrons)-T2A-mCherry-his-11::tbb-2 3'UTR] I; lin-3(n1058)IV/nT1[qIs51]IV;V</i>	UTR37
<i>fog-1(ø)</i>	GFP- progeny of <i>fog-1(q785) I/hT2 [bli-4(e937) let-?(q782) qIs48] (I;III)</i>	JK3743
<i>fog-1(ø) ERK-nKTR</i>	GFP- progeny of <i>fog-1(q785) arSi12[mex-5p::ERK-KTR(NLS3)-gfp(smu-lintrons)-T2A-mCherry-his-11::tbb-2 3'UTR] I/hT2 [bli-4(e937) let-?(q782) qIs48] (I;III)</i>	UTR25

Name in text	Genotype	Strain name
<i>fog-1(ø) ERK-nKTR(AAA)</i>	GFP- progeny of <i>fog-1(q785) arSi15[mex-5p::ERK-KTR(NLS3, S43A, T55A, T62A)-gfp(smu-1introns)-T2A-mCherry-his-11::tbb-2 3'UTR]I/hT2 [bli-4(e937) let-2(q782) qIs48] (I;III)</i>	UTR73
<i>let-60(gf)</i>	25 °C L4-upshifted <i>let-60(ga89)IV</i>	SD551
<i>ERK-nKTR; let-60(gf)</i>	25 °C L4-upshifted <i>arSi12[mex-5p::ERK-KTR(NLS3)-gfp(smu-1introns)-T2A-mCherry-his-11::tbb-2 3'UTR] I; let-60(ga89)IV</i>	UTR63
<i>ERK-nKTR(AAA); let-60(gf)</i>	25 °C L4-upshifted <i>arSi15[mex-5p::ERK-KTR(NLS3, S43A, T55A, T62A)-gfp(smu-1introns)-T2A-mCherry-his-11::tbb-2 3'UTR] I; let-60(ga89)IV</i>	UTR60
<i>mpk-1(DT)</i>	<i>mpk-1(q1147[V5::mpk-1b]*q1183[mpk-1ab::2xOLLAS])III</i>	JK6383
<i>mpk-1(ø)</i>	Non-Rol progeny of <i>mpk-1(ga117)/qC1[dpy-19(e1259) glp-1(q339) qIs56[rol-6(su1006)gf; Plag-2::GFP]]III</i>	UM434
<i>ERK-nKTR; mpk-1(ø)</i>	Non-Rol progeny of <i>arSi12[mex-5p::ERK-KTR(NLS3)-gfp(smu-1introns)-T2A-mCherry-his-11::tbb-2 3'UTR] I; mpk-1(ga117)/qC1[dpy-19(e1259) glp-1(q339) qIs26[rol-6(su1006)gf; Plag-2::GFP]]III</i>	UTR228
<i>ERK-nKTR(AAA); mpk-1(ø)</i>	Non-Rol progeny of <i>arSi15[mex-5p::ERK-KTR(NLS3, S43A, T55A, T62A)-gfp(smu-1introns)-T2A-mCherry-his-11::tbb-2 3'UTR] I; mpk-1(ga117)/qC1[dpy-19(e1259) glp-1(q339) qIs26[rol-6(su1006)gf; Plag-2::GFP]]III</i>	UTR225
<i>mpk-1b(Δ)</i>	Non-Rol progeny of <i>mpk-1(q1147[V5::mpk-1b]*q1201[mpk-1b(125 bp deletion+frameshift)]*q1183[mpk-1ab::2xOLLAS])/qC1[qIs56]III</i>	JK6403
<i>mpk-1(Δ)</i>	Non-rol progeny of <i>mpk-1 (q1190)/qC1 [qIs26] III</i>	JK6432
<i>germline::MPK-1B</i>	<i>narSi2[Pmex-5::GFPo::MPK-1B + unc-119(+)]II; mpk-1(ga117)III</i>	UTR93
<i>soma::MPK-1A</i>	Non-Rol RFP+ progeny of <i>mpk-1(ga117)/qC1[dpy-19(e1259) glp-1(q339) qIs56[rol-6(su1006)gf; Plag-2::GFP]]III; narEx29-31[Psur-5::GFP::MPK-1A; Pmyo-3::mCherry]</i>	UTR129-131
<i>soma::MPK-1A; germline::MPK-1B</i>	<i>narSi2[Pmex-5::GFPo::MPK-1B + unc-119(+)]II; mpk-1(ga117)III; narEx29[Psur-5::GFP::MPK-1A; Pmyo-3::RFP]</i>	UTR133

Name in text	Genotype	Strain name
<i>gonad::MPK-1A</i>	Non-Rol RFP+ progeny of <i>mpk-1(gal17)/qC1[dpy-19(e1259) glp-1(q339) qIs26[rol-6(su1006)gf; Plag-2::GFP]]III; narEx33-35[Pckb-3::GFP::MPK-1A; Pmyo-3::RFP]</i>	UTR135-137
<i>hypodermis::MPK-1A</i>	Non-Rol RFP+ progeny of <i>mpk-1(gal17)/qC1[dpy-19(e1259) glp-1(q339) qIs26[rol-6(su1006)gf; Plag-2::GFP]]III; narEx42-44[Pdpy-7::GFP::MPK-1A; Pmyo-3::RFP]</i>	UTR144-146
<i>neuron::MPK-1A</i>	Non-Rol RFP+ progeny of <i>mpk-1(gal17)/qC1[dpy-19(e1259) glp-1(q339) qIs26[rol-6(su1006)gf; Plag-2::GFP]]III; narEx45-47[Prgef-1::GFP::MPK-1A; Pmyo-3::RFP]</i>	UTR147-149
<i>muscle::mpk-1A</i>	Non-Rol RFP+ progeny of <i>mpk-1(gal17)/qC1[dpy-19(e1259) glp-1(q339) qIs26[rol-6(su1006)gf; Plag-2::GFP]]III; narEx39-41[Pmyo-3::GFP::MPK-1A; Pmyo-3::RFP]</i>	UTR141-143
<i>gut::mpk-1A</i>	Non-Rol RFP+ progeny of <i>mpk-1(gal17)/qC1[dpy-19(e1259) glp-1(q339) qIs26[rol-6(su1006)gf; Plag-2::GFP]]III; narEx36-38[Pelt-7::GFP::MPK-1A; Pmyo-3::RFP]</i>	UTR138-140
<i>5-tissues::MPK-1A</i>	Non-Rol RFP+ progeny of <i>mpk-1(gal17)/qC1[dpy-19(e1259) glp-1(q339) qIs26[rol-6(su1006)gf; Plag-2::GFP]]III; narEx48-50[Pckb-3::GFP::MPK-1A; Pelt-7::GFP::MPK-1A; Pmyo-3::GFP::MPK-1A; Pdpy-7::GFP::MPK-1A; Prgef-1::GFP::MPK-1A; Pmyo-3::RFP]</i>	UTR150-152
<i>muscle::mCherry</i>	<i>narEx51[Pmyo-3::mCherry]</i>	UTR153
<i>mpk-1(ø); muscle::mCherry</i>	Non-Rol RFP+ progeny of <i>mpk-1(gal17)/qC1[dpy-19(e1259) glp-1(q339) qIs26[rol-6(su1006)gf; Plag-2::GFP]]III; narEx52-53[Pmyo-3::mCherry]</i>	UTR154-155

Table S5. Plasmid design. Related to STAR Methods.

Name	Description	Source material	Primers (5'->3')	Injection concentration
pUMP5	<i>MPK-1B cDNA</i>	N2 RNA, pMR377	ATGCCAACGTGGATACCTAAC, tgaaatgccaaaatcttagtgg	N/A
pNAR3	<i>Pmex-5::GFP::MPK-1B</i>	pUMP5, pJH01	GCCACGGACTCCAAGACATGCCAA CGTGGATACCTAAC, GCTTGAAAGGATTTTGCATTTATC CTGAAATGCCAAAATCTTAGTGG, CCACTAAGATTTTGGCATTTCAGG ATAAATGCCAAAATCCTTTCAAGC, GTTAGGTATCCACGTTGGCATGTC TTGGAGTCCGTGGC	10 ng/mL (repair template)
pXA2	<i>Psur-5::GFP::MPK-1A</i>	pTG96 ⁷⁴ , pNAR3	CTGCAGGAATTCGATATCAAGCTT ATGGCCGACGGAGAAG, GGGAAACAAAATGAAGAGAATCT GAAATGCCAAAATCTTAGTGG, CCACTAAGATTTTGGCATTTCAGA TTCTCTTCATTTTGTTCCC, CTTCTCCGTCCGCCATAAGCTTGA TATCGAATTCC	25 ng/mL
pPOM5	<i>Pckb-3::GFP::MPK-1A</i>	N2 DNA, pXA2	CTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGta gttttgctcacctaaaaaaatacc, CAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTACT CATgttaatttagcagcttttgagaaatga, tcatttctcaaaagctgctaaattaacATGAGTAA AGGAGAAGAAGCTTTTCACTG, ggtatttttttaggtgagcaaaaactaCTCCAGCT TTTGTTCCTTTAG	25 ng/mL
pPOM6	<i>Pelt-7::GFP::MPK-1A</i>	<i>Pelt-7::DAF-18⁷⁵</i> , pXA2	GGGAACAAAAGCTGGAGtacaatcgc ctctcacagtctg, TGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCAT ttttccagtcgactagagcag, ctgctctagtcgactggaaaaATGAGTAAAG GAGAAGAAGCTTTTCA, cagaactgtgagaggcgatttgaCTCCAGCTT TTGTTCCC	25 ng/mL
pPOM7	<i>Prgef-1::GFP::MPK-1A</i>	N2 DNA, pXA2	GGGAACAAAAGCTGGAGtaccgagtea actgaaatccgttcaaaa, TGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCAT cgtcgtcgtcgtgatg, catcgacgacgacgacgATGAGTAAAGGA GAAGAAGCTTTTCA, ttttgaacggatttcagttgactcggtgtaCTCCAGCT TTTGTTCCTTTAG	25 ng/mL

Name	Description	Source material	Primers (5'->3')	Injection concentration
pPOM8	<i>Pdpy-7::GFP::MPK-1A</i>	pMR737 ⁷⁶ , pXA2	GGGAACAAAAGCTGGAGtaccacgatt tctcgcaacaca, TGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCAT aaaagaacagggtgtgataaatgaat, attcattatcacaccctgttctttATGAGTAAAG GAGAAGAACTTTTCA, tgtgttcgagaaatcgtgggtaCTCCAGCTTT TGTTCCC	25 ng/mL
pPOM9	<i>Pmyo-3::GFP::MPK-1A</i>	pCFJ104 ⁴⁷ , pXA2	GGGAACAAAAGCTGGAGtacagtgatta tagtctctgttttcggt, TGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCAT ttctagatggatctagtggctg, cgaccactagatccatctagaaATGAGTAAAG GAGAAGAACTTTTCA, aacgaaaacagagactataatcactgtaCTCCAGC TTTTGTTCCC	25 ng/mL

Table S6. crRNA and repair sequences. Related to STAR Methods.

Name	Type	Sequence (5' →3')
Ce.Cas9.MK-1.1AH	crRNA	AAATTGTTAGGTATCCACGT
New 5' <i>mpk-1b</i> 1xV5	Repair template	ttaatttcagaaccacgaacatgATGCCAACGTGGATACCTAACGGATCC ggtaagcctatccctaaccctctcctcggtctAgatAGTAcTGGATCTAATTTGTG CGCACAGCCGACAACGAGAAAT
<i>mpk-1a</i> OLLAS	crRNA	GCGGCTGCAAGGAATAATGG
<i>mpk-1a</i> 2Xollas repair	Repair template	actaatCTAAACAGGATTCTGCCCTCCATTAGATCCctttcccatgaggegtgtcc GAGCTCgttggcgaatccagaCTGCTTTCCCATAAAGGCGTGGTCCAAGCTCGTT AGCGAATCCGGAGGATCCATTCTTGCAGCCGCTTCTGCCTCCATTTCG
<i>mpk-1b</i> crRNA	crRNA	AATGCTAAACCACCATCGAA
<i>mpk-1b</i> deletion repair	Repair template	tttcatattttctatcattcgtaacCTTTCTATGTCCTGAACGAGTGTACTGCCATTTCTGTT GTCTGACGTGGTTGGTTGCTCCATTTCGGTATGTTGCTCGACGATGGTGGTTTAG CATTCTCGTTGTCGG
<i>mpk-1</i> exon 3	crRNA	ttcttctgcagATGGCCGA
<i>mpk-1ab</i> deletion repair	Repair template	atactactaatCTAAACAGGATTCTGCCCTTCGGCCATctgcaagaagaaatgaatttta