

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DE *GDI-1* CHEZ LE NÉMATODE
CAENORHABDITIS ELEGANS :
IDENTIFICATION DE CIBLES THÉRAPEUTIQUES CONTRE CERTAINES
FORMES DE RETARD MENTAL

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ COMME
EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
RICHARD PERREAULT

JUIN 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je remercie chaleureusement mes parents de m'avoir encouragé tout au long de cette maîtrise. Je remercie également mes ami(e)s pour leur support : Étienne, Philippe, Fannie, Sabine, Louis, Sharon et Zuzana. Enfin, je remercie professeure Sarah Jenna pour ses excellentes idées scientifiques.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
RÉSUMÉ	x
CHAPITRE I	1
<i>Introduction</i>	2
Les protéines Rabs	2
<i>Les protéines Rabs et leurs régulateurs</i>	2
<i>Le transport vésiculaire</i>	2
<i>Les Rabs dans les neurones</i>	5
<i>Le rôle des protéines motrices dans le transport et dans la morphologie des neurones</i>	6
<i>Les Rabs et les protéines motrices, la livraison d'un récepteur en guise d'exemple</i>	9
RabGDIs	9
<i>αGDII et le retard mental</i>	9
<i>Le rôle de αGDI dans plasticité synaptique via la régulation de AMPAR</i>	11
<i>Gdil, l'homologue de GDII chez la souris</i>	12
<i>Gdil affecte la localisation cellulaire de Rab4 et Rab5, mais pas Rab3a</i>	12
<i>Phénotypes de GDII chez l'humain</i>	13
<i>Caenorhabditis elegans, le modèle animal</i>	13
<i>C. elegans et la génétique</i>	14
<i>L'ARNi chez C. elegans</i>	15
Étude de la fonction des gènes par les mutations et interactions génétiques	16
Identification de cibles thérapeutiques via notre prédicteur d'interactions génétiques.....	17
Objectif du travail de maîtrise	19
CHAPITRE II	20
<i>Matériels et méthodes</i>	21
<i>Résultats</i>	23
Caractérisation phénotypique des nématodes <i>gdi-1</i> (ARNi).....	23
La gonadogenèse chez <i>C. elegans</i> , phénotypes Gon et Tum	24
Maturation des oocytes et ovulation chez <i>C. elegans</i> , phénotype Emo	29
<i>gdi-1</i> et la régulation d'un membre de la famille des récepteurs LDLs	30
<i>gdi-1</i> (ARNi) provoque un défaut de morphologie des oocytes matures.....	32
CHAPITRE III	35

<i>Article scientifique</i> :	35
Contribution des auteur(e)s.....	36
CHAPITRE IV	37
<i>Discussion</i>	38
<i>gdi-1</i> joue des rôles importants dans la fertilité de <i>C. elegans</i>	38
<i>Rôle de gdi-1 au niveau germinale et somatique</i>	38
<i>Y a-t-il un lien entre les phénotypes observés chez C. elegans gdi-1 (ARNi)</i>	39
La myosine, son rôle dans la contraction et dans la morphologie des neurones	40
<i>L'inhibition de la myosine et de MLCK suppriment certains phénotypes de gdi-1 (ARNi)</i>	40
<i>L'ovulation chez C. elegans</i>	40
<i>La myosine et son inhibiteur blebbistatine dans la morphologie des neurones</i>	42
<i>MLCK et son inhibiteur ML-7 dans la plasticité synaptique</i>	44
<i>ML-7 comme agent thérapeutique potentiel contre le RM</i>	44
Antagonisme entre <i>gdi-1</i> et <i>dys-1</i> , identification de cibles thérapeutiques contre le RM et la dystrophie musculaire.....	45
<i>Le complexe DGC</i>	45
<i>Dystrobrevine et le DGC dans la dystrophie musculaire</i>	47
<i>Dystrobrevine et le DGC dans le cerveau</i>	48
<i>Dystrobrevine dans la signalisation cellulaire</i>	48
<i>Les agents ML-7 et blebbistatine chez le modèle de dégénérescence musculaire chez C elegans</i>	50
Les microtubules seraient un lien dans l'interaction entre <i>gdi-1</i> et <i>aspm-1</i>	50
L'antagonisme de <i>gdi-1</i> et <i>tra-4</i>	52
Les RabGDI joueraient un rôle primordiale dans la morphologie cellulaire.....	52
<i>gdi-1 et le cytosquelette</i>	56
Perspectives	56
<i>Conclusion</i>	59
Références	60

Liste des Figures

Figure 1.1 Le cycle des Rabs dans un exemple d'exocytose.

Figure 1.2 Étapes principales du transport vésiculaire.

Figure 1.3 Schéma représentant quelques fonctions et localisations des Rabs dans divers processus neuronaux.

Figure 1.4 Transport vésiculaire sur microtubules et voies de signalisations de trafic intracellulaire.

Figure 1.5 Image représentant le transport d'une vésicule sur un microtubule via la protéine motrice kinésine.

Figure 1.6 Les protéines motrices.

Figure 1.7 Altération dans les synapses du RM.

Figure 1.8 Construction du plasmide ARNi dans les bactéries HT115 (DE3).

Figure 1.9 Notre stratégie pour identifier des cibles thérapeutiques.

Figure 2.1 Système reproducteur de l'hermaphrodite *C. elegans*.

Figure 2.2 Développement de la gonade selon les différents stades larvaires (L1 à L4).

Figure 2.3 Marquage des noyaux des cellules germinales de la gonade et phénotype Tum.

Figure 2.4 Formes des gonades du type sauvage (A) et de certains mutants (B à F) qui ont une altération de migration.

Figure 2.5 Coloration des gonades disséquées du sauvage (N2) (a) et de *gdi-1* (ARNi) (b) à l'anti-BrdU.

Figure 2.6 *gdi-1* (ARNi) provoque une accumulation de YP170-GFP dans l'espace pseudocoelomique et intercellulaire, selon des micrographies fluorescentes d'oocytes dans la partie proximale de la gonade d'animal sauvage (A) et d'animal *gdi-1* (ARNi) (B).

Figure 2.7 Anomalies de morphologie des oocytes chez *gdi-1* (ARNi).

Figure 4.1 Contraction musculaire selon qu'il s'agisse du muscle squelettique, cardiaque ou lisse.

Figure 4.2 Photographie représentant les principales parties neuronales et la communication entre deux neurones.

Figure 4.3 Morphologie des épines dendritiques.

Figure 4.4 Le complexe DGC ou DAC est situé à la membrane plasmique.

Figure 4.5 ASPM-1 interagit avec la protéine motrice dynéine et les microtubules du positionnement du fuseau mitotique.

Figure 4.6 L'implication des Rabs et du cytosquelette dans la migration cellulaire.

Liste des abréviations

AMPAR	<i>α-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate receptor</i>
AND	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNi	ARN interférent
ARNm	ARN messenger
ASPM	<i>abnormal spindle-like, microcephaly-associated</i>
ATPase	hydrolase de l'ATP
ATP	adénosine triphosphate
BrdU	bromodéoxyuridine
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CGC	<i>C. elegans Genetic Center</i>
DAC	<i>dystrophin-associated complex</i>
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DGC	<i>dystrophine-glycoprotein complex</i>
DGN	homologue de dystroglycan chez <i>C. elegans</i>
DIC	<i>differential interference contrast</i>
DMD	dystrophie musculaire de Duchenne
DAC	<i>dystrophin-associated protein complex</i>
DTC	<i>distal tip cell</i>
dyb	dystrobrevine
dys	dystrophine
egfp	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
Emo	<i>endomitotique oocyte</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
F-actine	filament d'actine
GABA-R	<i>γ-aminobutyrique acid receptor</i>
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
<i>gdi-1</i>	gène <i>guanosine nucleotide dissociation inhibitor</i> , <i>C. elegans</i>

GDI-1	protéine <i>guanosine nucleotide dissociation inhibitor</i> , <i>C. elegans</i>
<i>GDI1</i>	gène <i>guanosine nucleotide dissociation inhibitor</i> , Humain
α ou β GDI	protéine <i>guanosine nucleotide dissociation inhibitor</i> , Humain
Gdi-1	gène <i>guanosine nucleotide dissociation inhibitor</i> , souris
GDP	<i>guanosine diphosphate</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
Gon	phénotype d'anomalie dans la gonadogenèse
GTPases	hydrolase du GTP
GTP	<i>guanosine triphosphate</i>
IPTG	<i>isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
Kif	kinésine
KO	<i>knock-out</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LTP	<i>long term potentiation</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MLCK	kinase des chaînes légères de myosine
MSP	<i>major sperm protein</i>
MT	microtubule
Muv	<i>multivulva</i>
NCCR	<i>National Center for Research Resources</i>
NIH	<i>national institutes of health</i>
NMDA-R	<i>acide N-méthyl-D-aspartique receptor</i>
NO	oxyde nitrique
nNOS	<i>neuronal nitric oxide synthase</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinases</i>
PKA	protéine kinase A
PKC γ	protéine kinase C γ

PSD	<i>post-synaptique densitie</i>
RM	retard mental
RME	<i>receptor-mediate endocytosis</i>
RNase	ribonucléase
RTK	<i>receptor tyrosine kinase</i>
Ste	phénotype de stérilité
SynMuvB	<i>synthetic multimulva B</i>
Tum	phénotype de cellules germinales tumorales
UNC	<i>uncoordinated movement</i>
VPA	acide valproïque ou valproate
Vul	<i>vulvaless</i>

Résumé

Le retard mental (RM) est une maladie incurable qui affecte 2 à 3 % de la population. Des mutations dans le gène *GDI1*, codant pour *GDI α* , un régulateur des GTPases Rab, sont associées à un RM chez l'homme. Un médicament ayant pour cible un gène ayant une fonction antagoniste à *GDI1* pourrait réduire les symptômes de la maladie. Une mutation suppressive est une 2^e mutation à un site différent de la mutation à l'étude, qui supprime le phénotype de la première mutation. Afin d'identifier ces supresseurs génétiques, nous utilisons une approche couplant la génomique intégrative et la génétique chez un animal modèle, le nématode *Caenorhabditis elegans*. La réduction de l'expression de *gdi-1* par traitement des nématodes à l'ARN interférent (ARNi) nous a permis d'observer 7 phénotypes : la stérilité (Ste); une altération de la morphologie de la gonade (Gon); une accumulation d'oocytes endomitotiques (Emo); une diminution de la contraction des cellules myoépithéliales de la gaine de la gonade, un défaut de morphologie des oocytes matures et une inhibition de l'endocytose des particules yolk (YP170-GFP) par les oocytes. Nous montrons que *gdi-1* joue un rôle important dans le contrôle de la morphologie des gonades et des oocytes. Notre laboratoire a récemment développé un outil bioinformatique permettant la prédiction d'interactions génétiques chez *C. elegans*. Nous avons utilisé les prédictions faites pour *gdi-1* afin d'estimer la performance de ce prédicteur. Cette étude nous a permis d'identifier des partenaires fonctionnels de *gdi-1* dont les fonctions neurologiques ont déjà été reconnues chez l'homme et de prouver le grand potentiel prédictif de notre outil bioinformatique. Parmi les partenaires fonctionnels identifiés pour *gdi-1*, il y a *dyb-1* (dystrobrevin) qui est l'orthologue le plus près de dystrobrevine chez l'homme, une protéine associée à certaines formes de RM et une dystrophie musculaire. De plus, *gdi-1* (ARNi) diminue le phénotype de dystrophie musculaire associé à *dyb-1*. Plusieurs gènes qui interagissent avec *gdi-1*, interagissent aussi avec des protéines motrices, dont la myosine qui contrôle la contraction de la machinerie actine-myosine. Ces résultats sont en accord avec le rôle montré pour *gdi-1* dans le contrôle de la contraction de la gonade, ainsi que dans la morphologie des gonades et des oocytes. Notre approche nous a permis d'identifier des supresseurs génétiques de *gdi-1* chez le nématode *C. elegans* qui pourrait s'avérer être des cibles thérapeutiques prometteuses contre certaines formes de RM. De plus, cette approche nous a permis d'identifier une famille d'agents actifs pouvant être testée comme agents thérapeutiques contre les déficits neurologiques associés à la délétion fonctionnelle de *GDI-1* chez la souris.

Mots clés : *gdi-1*, retard mental, plasticité synaptique, dystrophie musculaire, ML-7, Rab, dystrobrevine, *Caenorhabditis elegans*, cible thérapeutique.

CHAPITRE I

Introduction

Introduction

Les protéines Rabs

Les protéines Rabs et leurs régulateurs

L'énorme flux de trafic des membranes à l'intérieur d'une cellule nécessite un contrôle rigoureux du taux et de la spécificité du trafic. La famille des Rabs fait partie de la superfamille des petites GTPases Ras et joue des rôles importants dans le contrôle du trafic membranaire autant dans les voies de signalisation d'endocytose que celles de l'exocytose (Bachner, Sedlacek et al. 1995). Plus de 60 membres de la famille des Rabs sont encodés par le génome humain. Selon un cycle d'échange GDP-GTP, les Rabs fonctionnent comme des commutateurs moléculaires pour médier le transport vésiculaire le long du cytosquelette en recrutant des protéines motrices spécifiques, et en assurant l'attachement et la fusion des vésicules aux membranes cibles. La forme GDP est inactive alors que la forme GTP est active. Les Rabs sont régulés par trois classes de protéines. Les GEFs régulent de manière positive en favorisant l'échange du GDP en GTP. À l'opposé, les GAPs augmentent l'activité GTPase intrinsèque des Rabs donc le passage de la forme GTP active vers la forme GDP inactive (Pfeffer and Aivazian 2004). Enfin, les GDIs détachent la forme GDP inactive des Rabs de la membrane pour former un complexe soluble dans le cytosol qui servira de réserve pour une réutilisation ultérieure (Sasaki, Kikuchi et al. 1990) (Figure1,1).

Le transport vésiculaire

Le transport vésiculaire peut être divisé en deux groupes, celui impliqué dans l'internalisation des membranes (endocytose) et celui impliqué dans la sécrétion de ces membranes (sécrétion /exocytose). Dans le premier cas, le trajet de la vésicule commence à la membrane plasmique et finit généralement au lysosome, alors que dans le deuxième cas, le trajet va du réticulum endoplasmique vers la membrane

plasmique. Les deux voies communiquent entre elles via des vésicules intermédiaires (Seabra, Mules et al. 2002).

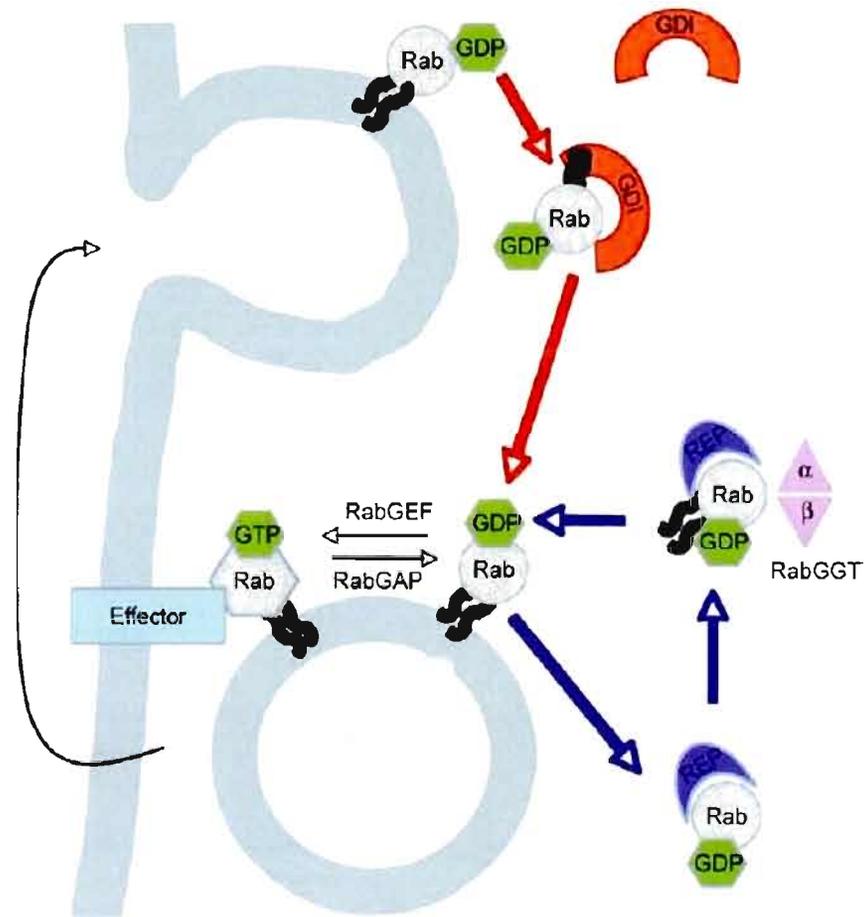


Figure 1.1 Le cycle des Rabs dans un exemple d'exocytose. La liaison avec la protéine (REP) est essentielle pour la prénylation de la Rab par la Rab géranylegéranyle transférase (RabGGT). Le recyclage d'une Rab d'un compartiment accepteur vers un compartiment donneur est facilité par GDI. REP et GDI peuvent lier la forme GDP inactive de la Rab. Une fois que REP ou GDI libère une Rab à la membrane donneuse, la Rab peut être activé en GTP par un des facteurs d'échange de guanine (RabGEFs), ce qui permet notamment la fusion de la vésicule à la membrane plasmique. Les Rabs sont désactivés par les protéines activatrices des GTPases (RabGAPs). Les RabGEFs et RabGAPs accélèrent le faible taux intrinsèque d'échange de nucléotides ou d'hydrolyse du GTP des Rabs. Dans leur forme active, les Rabs interagissent avec une multitude de protéines effectrices comme les complexes de cargos d'une membrane donneuse, les protéines motrices et des complexes à la membrane accepteuse pour la fusion. Tiré de (Corbeel and Freson 2008).

Les Rabs sont solubles et subissent une modification post-traductionnelle de composés isoprénoïdes qui leur permet de s'associer aux membranes des organelles et des vésicules intracellulaires (Pereira-Lcal, Hume et al. 2001). Les Rabs qui possèdent cette addition de lipide sont dirigées vers des membranes spécifiques et montrent alors des localisations subcellulaires caractéristiques. (Seabra, Mules et al. 2002). Dans la forme active, les Rabs recrutent divers groupes de protéines effectrices, ce qui permettrait aux Rabs de contrôler les différentes étapes du transport vésiculaire, incluant la sélection du cargo, la formation de la vésicule à partir de la membrane donneur, l'association de la vésicule à la membrane du compartiment accepteur et la fusion (Zerial and McBride 2001). Une fois les Rabs inactivées, les effecteurs se dissocient et c'est à ce moment que les Rabs peuvent être retirées de la membrane par les RabGDIs et être de nouveau recyclées vers un compartiment donneur (Alory and Balch 2001). La Figure 1.2 présente un exemple de transport vésiculaire typique.

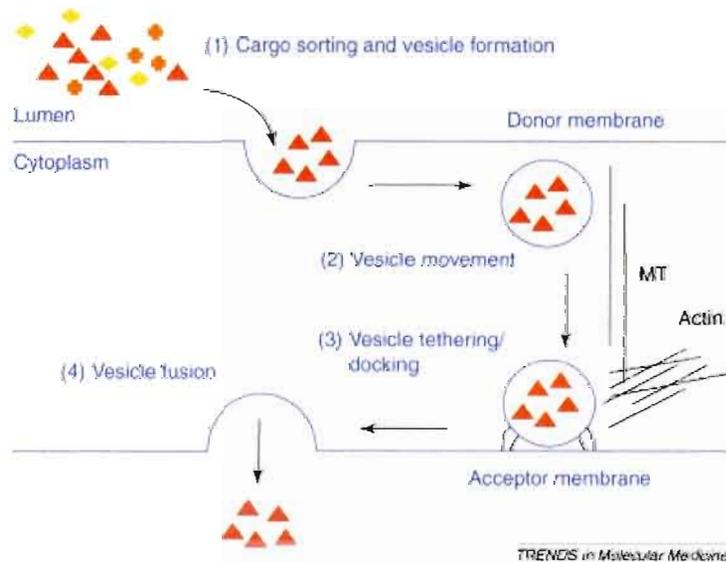


Figure 1.2 Étapes principales du transport vésiculaire. Premièrement, les molécules cargos sont concentrées près du compartiment donneur et sont enfermées dans une vésicule en bourgeonnement qui se détache de la membrane de l'organelle donneur (Rab1, Rab2, Rab5 et Rab9). Deuxièmement, les vésicules se déplacent dans le

cytoplasme via le cytosquelette (sec4, Rab5, Rab6 et Rab27). Troisièmement, les vésicules s'associent à la membrane de l'organelle accepteuse (Ypt1, Ypt7, Sec4, Rab1 et Rab5). Enfin, il y a fusion de la vésicule à la membrane accepteuse, libérant les molécules cargos dans la lumière de l'organelle cible ou dans l'espace extracellulaire. Tiré de (Seabra, Mules et al. 2002).

Les Rabs dans les neurones

Les protéines Rabs jouent des rôles particuliers dans les neurones. Elles participent au développement du système nerveux central (Rab23), à la croissance polarisée des neurites (Rab8 et 11), à l'endocytose et au transport rétrograde axonal (Rab5 et 7), à l'exocytose des vésicules synaptiques (Rab3) et au contrôle du trafic des récepteurs au glutamate AMPA aux membranes post-synaptiques (Rab8). Revue par (Ng and Tang 2008) (Figure 1.3).

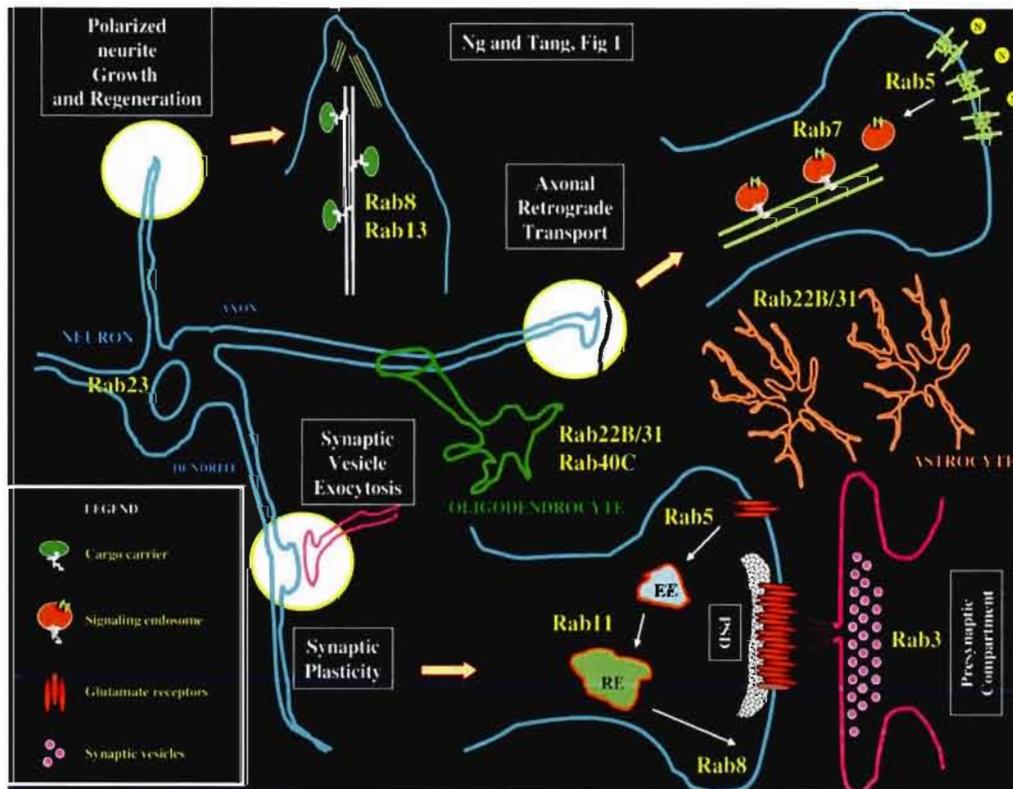


Figure 1.3 Schéma représentant quelques fonctions et localisations des Rabs dans divers processus neuronaux. Tiré de (Ng and Tang 2008)

Le rôle des protéines motrices dans le transport et dans la morphologie des neurones

Les protéines motrices jouent aussi un rôle important dans la morphologie des neurones. (Georges, Hadzimichalis et al. 2008). Le fonctionnement adéquat des protéines motrices et des protéines Rabs est essentiel pour le transport précis des cargos de protéines et pour les diriger aux bons sites via le mouvement sur les voies du cytosquelette (Hirokawa and Takemura 2004). Au début des années 2000, le rôle des Rabs dans l'endocytose et dans la fusion des vésicules était relativement bien connu, mais le rôle des Rabs dans le transport des vésicules fut obscur jusqu'à tout récemment (Jordens, Marsman et al. 2005). Deux réseaux de supports sont utilisés par les protéines motrices : les filaments d'actines et les microtubules. Dans les cellules animales, les microtubules procurent un transport de longues distances et de haute vitesse comparé au réseau d'actine. La majorité des transports intracellulaires s'effectuent sur le réseau de microtubules, à l'aide des protéines motrices kinésines et dynéines (Figure 1.4). Plus de 14 kinésines (KIFs) jouent un rôle critique en transportant les cargos de protéines dans la direction plus des MTs, vers la membrane plasmique, alors que 2 dynéines procurent un transport vers le noyau (Jordens, Marsman et al. 2005). Les Kifs transportent, entre autre, les protéines du PSD, les récepteurs des neurotransmetteurs, les canaux ioniques et des ARNm spécifiques jusqu'aux dendrites (Figure 1.5) (Hirokawa and Takemura 2005). Les Kifs réguleraient le branchement des dendrites via leur interaction avec PSD-95 (Mok, Shin et al. 2002). Les membres de la famille des myosines effectuent le transport sur le réseau d'actine, qui est très présent au niveau du cortex cellulaire (Figure 1.6). Ils transportent les cargos à des sites très spécifiques (Georges, Hadzimichalis et al. 2008). Les classes de myosines I, II, V, VI et IX sont présentes dans les neurones (Bridgman 2004). La myosine IIB joue un rôle dans la régulation motrice de la dynamique dans le cône axonal en croissance et en rétraction. La morphologie change lorsque la myosine IIB permet aux fibres de F-actines de sortir du filopode et que les dynéines permettent aux MTs d'entrer dans le filopode

(Myers, Tint et al. 2006). Les microtubules sont polymérisés dans le centre d'organisation des microtubules situé près du noyau et sont ultimement transportés dans la dendrite en formation via les protéines motrices (Kirschner and Mitchison 1986; McAllister 2000).

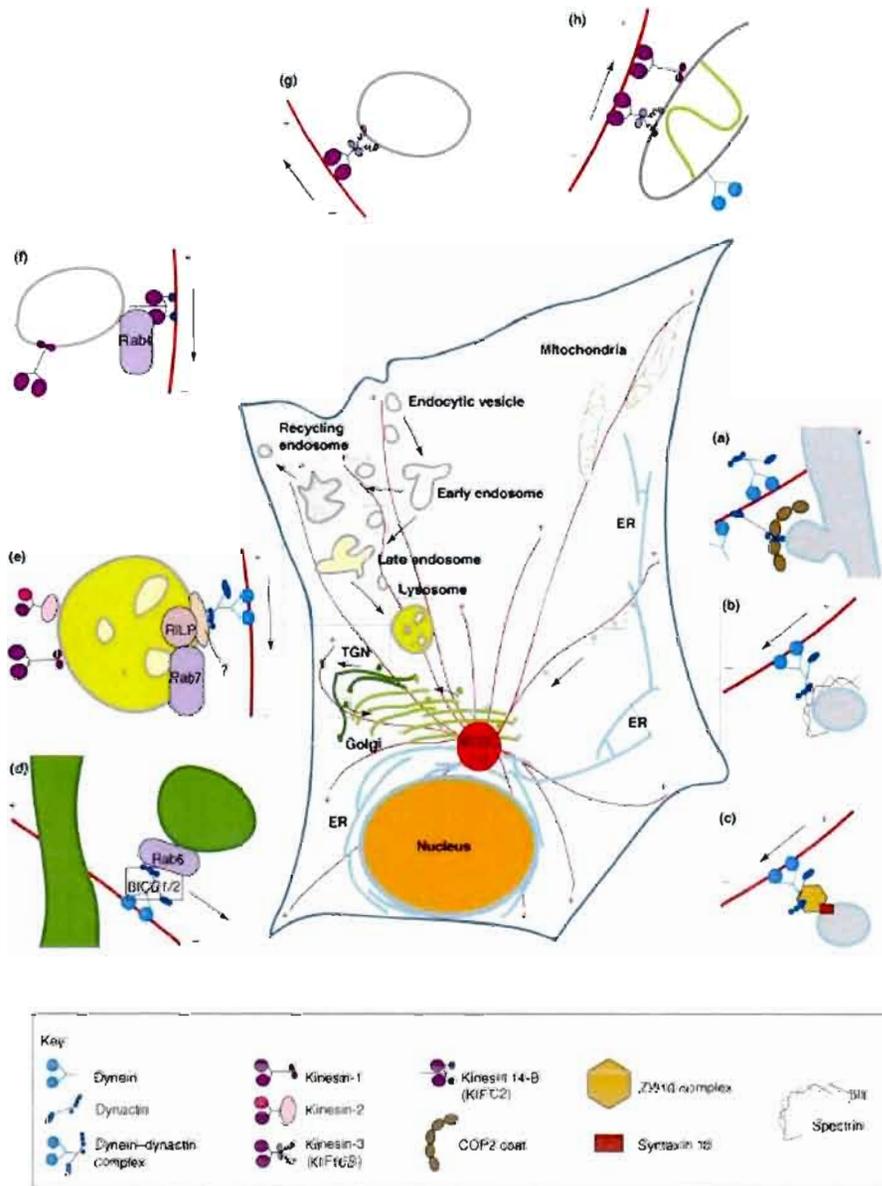


Figure 1.4 Transport vésiculaire sur microtubules et voies de signalisations de trafic intracellulaire. Tiré de (Caviston and Holzbaur 2006).

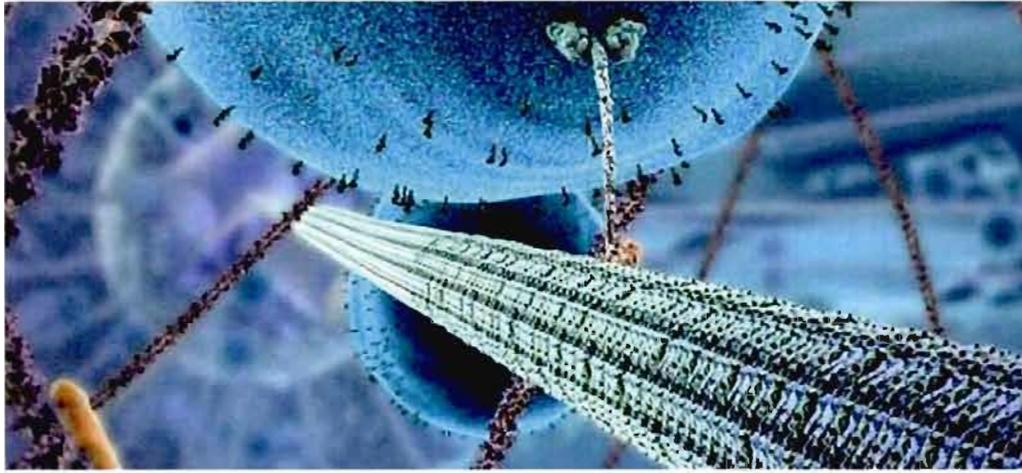


Figure 1.5 Image représentant le transport d'une vésicule sur un microtubule via la protéine motrice kinésine. Tiré de la vidéo d'animation biovision XVIVO de John Libler, de l'Université de Harvard.

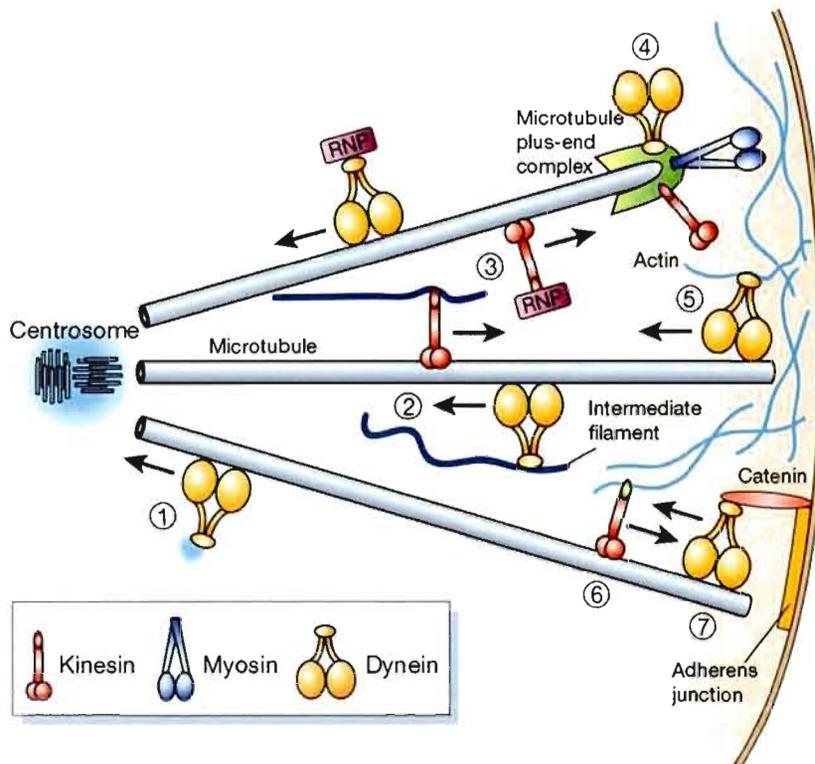


Figure 1.6 Les protéines motrices. Les kinésines voyagent vers la membrane plasmique via les microtubules. Les dynéines font le chemin inverse, toujours via les microtubules. Les myosines voyagent surtout au niveau du cortex cytoplasmique, via le réseau d'actine. Tiré de (Schliwa and Woehlke 2003).

Les Rabs et les protéines motrices, la livraison d'un récepteur en guise d'exemple

La livraison du récepteur à glucose (GLUT4) vers la membrane, contrôlée par l'insuline, illustre un bon exemple de l'interaction entre les Rabs et les protéines motrices (Jordens, Marsman et al. 2005). Cette translocation du récepteur GLUT4 est due à la fois à la diminution de l'endocytose et une augmentation de l'exocytose (Pessin, Thurmond et al. 1999). L'association de KIF3B avec Rab4 favorise l'exocytose du récepteur. L'insuline active Rab4 par PI3K et PKC γ , ce qui augmente son association avec KIF3B (Imamura, Huang et al. 2003). De plus, l'insuline augmente aussi la liaison de KIF3B avec les MTs encore via l'activité de PI3K et PKC γ . Étant donné que la phosphorylation des kinésines affecterait leur liaison avec les MTs, il est possible que KIF3B soit une cible de ces kinases (Reilein, Tint et al. 1998). Pour ce qui est de l'endocytose, l'insuline diminue le transport de Rab5 et GLUT4 sur les MTs via la dynéine encore grâce à PI3K et PKC γ (Huang, Imamura et al. 2001; Vaughan, Miura et al. 2002). Donc la stimulation par l'insuline fournit une livraison efficace de GLUT4 à la membrane plasmique.

RabGDIs

α GDI1 et le retard mental

Deux types de mutations dans le gène *GDII* (Figure 1,1) qui code pour la forme α GDI ont été identifiés chez deux familles atteintes de (RM). La première mutation est une substitution de la leucine 92 affectant la liaison avec les Rabs et la deuxième mutation est nulle. (D'Adamo, Menegon et al. 1998). Dans certains cas, le retard mental peut faire partie d'un syndrome complexe. Les mutations dans *GDII* engendrent plutôt un retard mental non spécifique, sans autre phénotype que celui du handicap mental (D'Adamo, Menegon et al. 1998). Les GDIs sont extrêmement bien conservés. Il y a deux gènes codant pour alfa et beta GDI. La forme alfa est la plus abondante dans le cerveau (Bachner, Sedlacek et al. 1995). Certaines Rabs

s'associent préférentiellement avec soit α GDI ou β GDI même si cette forme n'est pas la plus abondante dans la cellule. Les complexes α et β GDI/Rab ont probablement des rôles distincts dans l'attachement ou le recyclage des vésicules (Erdman and Maltese 2001).

Environ 300 gènes sont reliés au RM, maladie qui affecte 2 à 3 % de la population (Inlow and Restifo 2004). On peut séparer les gènes du RM en 2 groupes : ceux impliqués dans le développement du cerveau engendrant des malformations; et ceux impliquant des altérations des mécanismes moléculaires sous-jacents à l'organisation et la plasticité synaptique (Vaillend, Poirier et al. 2008). Il est difficile de classer *GDI* dans un des 2 groupes étant donné que les Rabs sont impliquées dans une multitude de processus biologiques. La Figure 1.7 résume les différentes altérations synaptiques du RM.

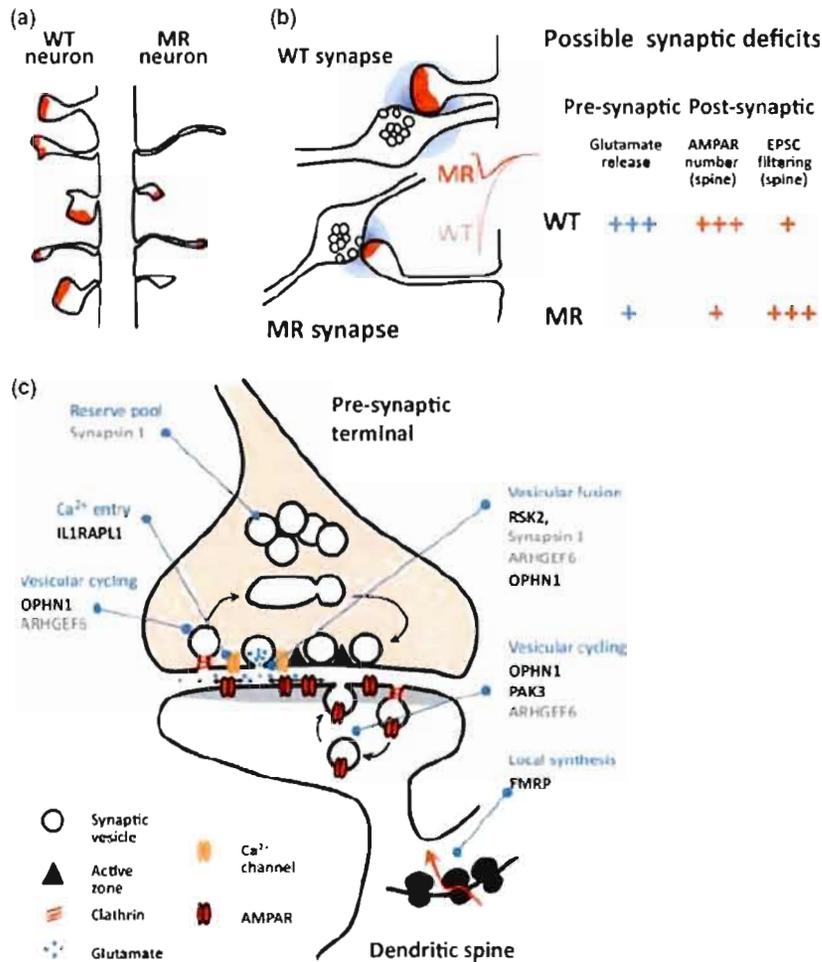


Figure 1.7 Altérations dans les synapses du RM. (a) Les épines dendritiques observées chez les souris RM sont souvent dysmorphiques. (b) Déficiences dans la physiologie synaptique. (c) Illustration d'une synapse excitatrice typique. Les produits des gènes RM qui sont ou seraient impliqués dans des étapes clés du cycle vésiculaire. Tiré de (Humeau, Gambino et al. 2009).

Le rôle de α GDI dans plasticité synaptique via la régulation de AMPAR

Les connexions synaptiques des neurones sont continuellement remodelées en réponse à l'activité neuronale. Cette plasticité synaptique est très importante dans les fonctions cognitives comme la mémoire et l'apprentissage (Bliss and Collingridge 1993; Brown, Tran et al. 2005). Par exemple, le trafic du récepteur AMPA dans les

synapses est un facteur important dans le changement d'efficacité de communication synaptique. Chez l'humain, Rab5 régule l'endocytose d'AMPAR dans la synapse d'une façon clathrine dépendante et α GDI régule Rab5 dans cette endocytose (Huang, You et al. 2004; Brown, Tran et al. 2005).

Gdi1, l'homologue de GDI1 chez la souris

L'homologue de *GDI1* chez la souris, *Gdi1*, est exprimé tôt dans le développement et est surexprimé aux stades précoces de différenciation du cerveau, suggérant un rôle dans la migration ou la différenciation neuronale (D'Adamo, Menegon et al. 1998). La souris *Knock-out Gdi1* présente des phénotypes similaires aux personnes atteintes de RM, soit des comportements et des fonctions cognitives altérés (D'Adamo, Welzl et al. 2002). *Gdi1* est important pour les mécanismes impliqués dans la formation de la mémoire à court terme dans l'hippocampe. Ces mutants montrent aussi des altérations au niveau des comportements sociaux (D'Adamo, Welzl et al. 2002), altérations habituellement reliées à l'amygdale (Miczek, Maxson et al. 2001).

Gdi1 affecte la localisation cellulaire de Rab4 et Rab5, mais pas Rab3a

Rab3a est la Rab la plus abondante dans le cerveau, elle participe à la fusion des vésicules synaptiques et la sécrétion des neurotransmetteurs (Schluter, Khvotchev et al. 2002). Il a été suggéré que Rab3a soit régulée par α GDI. L'analyse électrophysiologique chez la souris mutante pour *Gdi1* démontre des altérations dans la plasticité synaptique à court terme (Ishizaki, Miyoshi et al. 2000). Ces paramètres électrophysiologiques sont différents de ceux de la souris *Knock out Rab3a* (Lonart, Janz et al. 1998) et sont en contradiction avec l'hypothèse que le manque de *Gdi1* agit en altérant la fonction de *Rab3a* (D'Adamo, Welzl et al. 2002). De plus, les phénotypes observés chez la souris *Rab3a* ne montrent aucune relation avec les changements de comportements observés chez la souris *Gdi1* (D'Adamo, Wolfer et al. 2004). Le manque d' α GDI n'affecte pas la localisation subcellulaire de Rab3a

mais plutôt d'autres Rabs, notamment Rab4 et Rab5 qui sont impliquées dans l'endocytose. Chez la souris *Gdi1*, ces Rabs sont alors accumulées à la membrane et ne sont donc plus disponibles dans le cytosol pour une réutilisation (D'Adamo, Welzl et al. 2002). Le manque d' α GDI perturbe la biogenèse et le recyclage des vésicules synaptiques dans l'hippocampe. L'altération de la quantité de vésicules synaptiques de réserve pourrait être causée par un système endosomal défectueux et pourrait causer les altérations de la plasticité à court terme observées. D'ailleurs, les déficits de mémoire à court terme disparaissent lorsqu'il y a plus de temps entre les sessions d'apprentissage des différents tests de cognition effectués chez la souris *Gdi1* (Bianchi, Farisello et al. 2009).

Phénotypes de GDII chez l'humain

Une étude neuropsychologique et d'imagerie a été réalisée sur 5 patients provenant de 2 familles dont le gène *GDII* est muté. Tous les patients avaient un RM léger (QI entre 41-50) sans anomalie apparente de morphologie ou de comportement. Il y avait chez les patients des anomalies structurelles localisées en majorité dans le circuit cérébello-thalamo-préfrontal (Curie, Sacco et al. 2009). Des analyses chez la souris *GDII* suggéraient une dysfonction au niveau de l'hippocampe (Ishizaki, Miyoshi et al. 2000; D'Adamo, Welzl et al. 2002). D'ailleurs, les modèles théoriques actuels d'apprentissage par associations suggèrent une étroite interaction entre le cervelet et l'hippocampe. De plus, *GDII* est un gène ubiquitaire et le manque d' α GDI cause probablement des déficiences dans différentes régions du cerveau plutôt qu'à un endroit spécifique (Curie, Sacco et al. 2009).

Caenorhabditis elegans, le modèle animal

Au début des années 60, Sydney Brenner propose *C. elegans* comme modèle animal pour étudier le développement animal et le système nerveux. Le cycle de vie de l'animal est très court et sa simplicité permet la manipulation d'une grande quantité d'animaux et il est approprié pour l'analyse génétique. Il s'agit d'un nématode de sol

d'environ 1 mm de long et la transparence de l'animal permet la visualisation facile, l'enregistrement de processus cellulaire ainsi que l'observation *in vivo* de marqueurs fluorescents (Artal-Sanz, de Jong et al. 2006). Il y a néanmoins un haut taux de différenciation chez cet animal; des cellules musculaires, un hypoderme, un système nerveux, des intestins, des gonades, des glandes et un système excréteur. De plus, tout le réseau des 302 neurones a été cartographié (Riddle, Blumenthal et al. 1997). Son génome est complètement séquencé, avec 60-80% d'équivalence chez l'humain (Harris, Chen et al. 2004). *C. elegans* est le seul organisme multicellulaire qui peut être congelé dans l'azote liquide indéfiniment, ce qui permet l'obtention d'une grande librairie de mutants (Artal-Sanz, de Jong et al. 2006).

C. elegans est utilisé pour étudier un certain nombre de maladies humaines affectant des processus biologiques conservés entre l'homme et le nématode (Artal-Sanz, de Jong et al. 2006). Parmi ces maladies, notons la dystrophie musculaire (Gaud, Simon et al. 2004; Kim, Rogers et al. 2004) et les maladies neurodégénératives telles que : l'Alzheimer (Levitan and Greenwald 1995; Link 1995; Sherrington, Rogaev et al. 1995), le Parkinson (Lakso, Vartiainen et al. 2003) et la maladie d'Huntington (Faber, Alter et al. 1999). La découverte de nouveaux médicaments grâce à *C. elegans* ne fait que commencer, notons un sensibilisant à l'insuline pour le traitement du diabète de type 2 et un modulateur de canaux ionique voltage dépendant (Artal-Sanz, de Jong et al. 2006).

C. elegans et la génétique

Avant que le génome de *C. elegans* soit complètement séquencé, 30 ans d'études en génétique classique avaient permis d'identifier et de caractériser à peine 4% des gènes de *C. elegans*. Grâce aux séquences du génome du nématode, il est possible d'étudier les fonctions des gènes à l'échelle du génome grâce à l'utilisation des ARN interférents (ARNi) et des banques de mutants (Rual, Ceron et al. 2004). Cette méthode consiste à identifier les fonctions des gènes en étudiant les phénotypes

causés par la diminution du niveau d'expression d'un gène ou par sa mutation. En 2003, Kamath et al. ont créé une librairie d'ARNi par alimentation (Timmons and Fire 1998) générée par amplification PCR de fragment d'ADN génomique. Cette ressource a ciblé à elle seule près de 80% des quelques 20 000 gènes de *C. elegans*. Ils ont identifié des phénotypes pour 1722 de ces gènes (Kamath, Fraser et al. 2003). Ce type d'étude représente un pas important vers la caractérisation phénotypique de tous les gènes de *C. elegans* (Rual, Ceron et al. 2004).

L'ARNi chez C. elegans

L'ARNi permet d'étudier la fonction des gènes. En 1998, les lauréats du prix Nobel de médecine 2006, Andrew Fire et Craig Mello, découvrent qu'en injectant un double brin d'ARN dans *C. elegans*, l'expression du gène correspondant est diminuée. Ce mode d'interférence fonctionne au-delà des barrières cellulaires (Fire, Xu et al. 1998). Ils ont alors montré la méthode par injection. Il y a aussi la méthode par alimentation (Timmons and Fire 1998) et par trempage (Tabara, Sarkissian et al. 1999). La méthode utilisée dans notre étude est celle par alimentation. Cette méthode a déjà montré une efficacité légèrement moindre que par injection. Néanmoins, la méthode par alimentation est très utilisée, car il est très facile d'effectuer le traitement sur beaucoup d'animaux et/ou pour beaucoup de gènes, cette méthode étant peu dispendieuse et ne demandant pas beaucoup de manipulations (Kamath, Martinez-Campos et al. 2001). Il s'agit de cloner un fragment du gène d'intérêt dans un plasmide entre deux promoteurs T7 orientés de façon inverse. (figure 1.8) On transforme ensuite le plasmide dans une souche de bactérie qui contient une T7 polymérase inducible à l'IPTG et déficiente en RNase III ciblant les ARN double brin, ce qui permet la production d'une grande quantité d'ARN double brins. *C. elegans* utilise ensuite ces bactéries pour se nourrir. Les bactéries sont alors digérées et l'ARN double brin est absorbé par l'intestin et distribué dans les tissus somatiques et les cellules germinales (Timmons and Fire 1998).

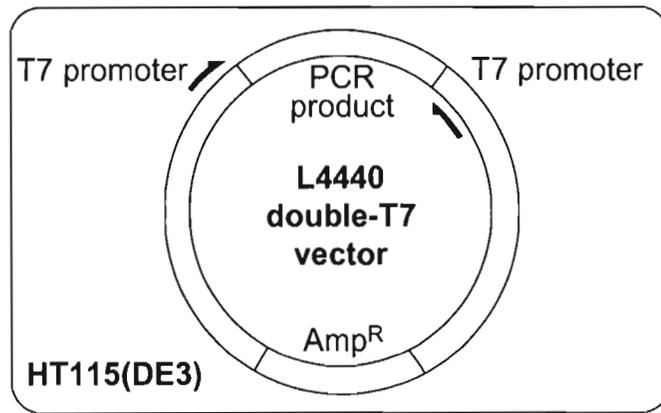


Figure 1.8 Construction du plasmide ARNi pL4440 dans les bactéries HT115 (DE3). Tiré de (Kamath, Martinez-Campos et al. 2001).

Étude de la fonction des gènes par les mutations et interactions génétiques

La mutation est un outil très utile pour étudier l'expression, la fonction et l'interaction génétique. Une mutation suppressive est une 2^e mutation à un site différent de la mutation à l'étude, qui supprime le phénotype de la première mutation. Alors qu'une mutation aggravante ou synergique a pour effet d'augmenter le phénotype de la première mutation (Hodgkin 2005). Dans ce dernier cas, le phénotype du double mutant doit être supérieur à la somme des phénotypes des simples mutants. Dans le cas où le phénotype du double mutant serait égal à la somme des simples mutants, l'interaction est dite additive et ne permet pas d'identifier de lien fonctionnel entre les deux gènes d'intérêt. Il est possible d'étudier les positions des gènes dans une voie de signalisation en étudiant ces interactions génétiques ainsi que les relations épistatiques entre les différentes mutations (Avery and Wasserman 1992). Un bon exemple de relation épistatique chez *C. elegans* implique la signalisation RTKRas/MAP kinase qui induit la différenciation des cellules de la vulve. Deux phénotypes opposés résultent soit d'une réduction ou d'une augmentation du niveau d'activation de la voie de

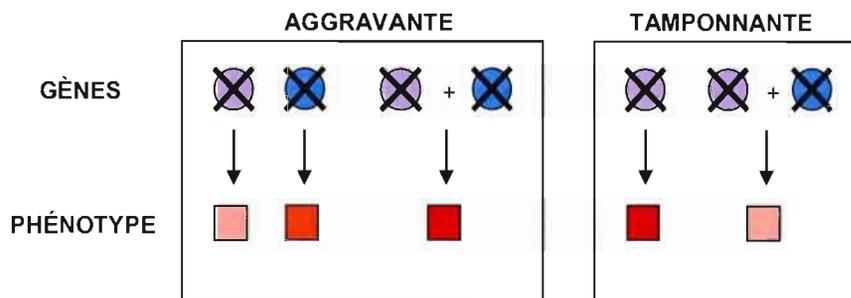
signalisation ERK MAP kinase dans les cellules précurseurs de la vulve. Ces phénotypes se nomment Vul (*vulvaless*) et Muv (*multivulva*) respectivement. Le phénotype des mutants affectant à la fois des gènes associés aux phénotypes Vul et Muv permet d'identifier l'ordre des cascades de signalisation. Si les mutations nulles des gènes A et B sont associées aux phénotypes Vul et Muv respectivement et que le mutant AB est Vul, alors A est en aval de B. Ce genre d'analyse a permis d'identifier plus de 30 gènes impliqués dans la signalisation EGF et de disséquer les voies de signalisation contrôlant la différenciation des cellules de la vulve (Hodgkin 2005).

Identification de cibles thérapeutiques via notre prédicteur d'interactions génétiques

Beaucoup de mécanismes biologiques requièrent un état d'homéostasie de signalisation maintenu par l'intégration appropriée de voies de signalisation antagonistes et synergiques, et ce, possiblement même entre différentes cellules (Schubert and Dotti 2007). D'ailleurs, les symptômes de plusieurs maladies résultent de mutations génétiques qui affectent cette homéostasie. Les relations entre les voies de signalisation suggèrent des pistes dans lesquelles l'homéostasie peut être restaurée et par le fait même les symptômes diminués. Plus spécifiquement, la perturbation dans une voie de signalisation causée par une mutation perte de fonction pourrait être compensée par une perturbation dans une voie de signalisation antagoniste. Une cible thérapeutique est le produit d'un gène, qui lorsqu'inactivé, diminue le(s) symptôme(s) d'une maladie (fig. 1.9). Cependant, identifier les gènes antagonistes à un gène impliqué dans différentes voies de signalisation est un défi qui ne peut être réalisé facilement grâce à une approche classique de dissection de voies de signalisation. Notre approche à ce défi consiste à identifier des interactions génétiques dans un organisme multicellulaire. Une interaction génétique entre deux gènes existe lorsque le phénotype résultant d'une perturbation dans un gène (p. ex. une mutation, un traitement ARNi, un agent pharmacologique) est dépendant d'une

perturbation dans un autre gène. Cependant, le nombre élevé de gène chez *C. elegans* (~ 20 000 gènes) et les procédures expérimentales parfois longues requises pour identifier certains phénotypes rend un criblage exhaustif d'interaction génétique infaisable. Toutefois, une approche *in silico* peut théoriquement considérer toutes les paires de gènes chez *C. elegans* pour identifier des interactions génétiques.

Interactions :



Identifier des cibles thérapeutiques:

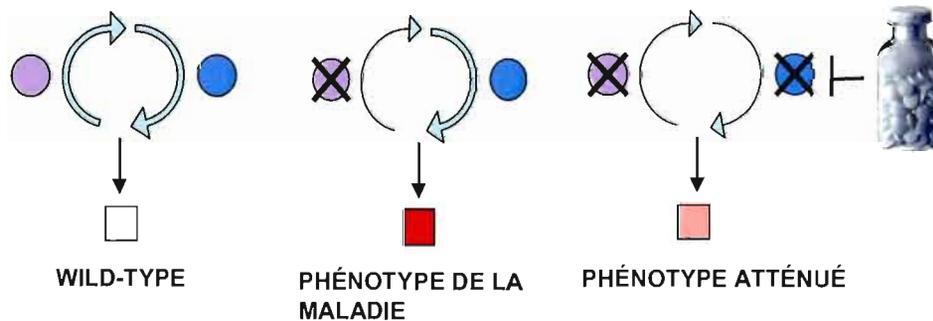


Figure 1.9 Notre stratégie pour identifier des cibles thérapeutiques. Une interaction aggravante a lieu lorsque l'intensité du phénotype résultant de la double altération génétique est plus élevée que l'addition de l'intensité de chacune des altérations génétiques. Alors qu'une interaction tamponnante survient lorsqu'une deuxième mutation diminue l'intensité du phénotype résultant de la première mutation. En ciblant le produit d'un gène antagoniste à un gène associé à une maladie, nous voulons diminuer les symptômes des maladies.

Les banques de données génomiques croissent de plus en plus. La bioinformatique est un outil de choix pour exploiter et intégrer ces données. La biologie intégrative

permet de comprendre les relations entre les différentes parties d'un système (Kitano 2002). Nous avons développé un prédicteur d'interactions génétiques qui contient des exemples d'interactions positives et négatives validées dans la littérature ainsi que des paires de gènes de *C. elegans* prélevées au hasard. Notre prédicteur utilise les interactions protéines-protéines, les données d'expressions génétiques et les observations phénotypiques pour mesurer la probabilité d'une interaction génétique entre deux gènes. Par exemple, une interaction physique entre deux protéines suggère une interaction génétique entre les gènes codants. Cependant, deux protéines qui n'interagissent pas physiquement peuvent quand même avoir des partenaires qui interagissent physiquement. Deux protéines qui auraient un grand nombre de partenaires en commun suggèrent que ces deux protéines seraient liées fonctionnellement et suggèrent donc une interaction génétique entre les gènes codant pour ces protéines. Pour chaque gène on définit aussi un voisinage fonctionnel qui consiste à la coexpression de gènes. (Voir l'article au chapitre III pour plus de détails.)

Objectif du travail de maîtrise

L'objectif du projet est d'identifier des suppresseurs génétiques de *gdi-1* afin d'identifier des cibles thérapeutiques pour les pathologies neurologiques associées aux mutations dans ce gène, qui pourraient être testées chez la souris.

Des études récentes démontrent d'ailleurs que les capacités cognitives peuvent être modulées par traitement chimique (McBride, Choi et al. 2005; Fernandez, Morishita et al. 2007). Nous avons donc d'abord créé le prédicteur d'interactions génétiques. Ensuite nous avons caractérisé les phénotypes résultants de la diminution de l'expression de *gdi-1* via l'ARNi chez *C. elegans*. Cela nous a permis de valider les interactions prédites pour *gdi-1* par notre modèle bioinformatique. Finalement, nous avons identifié une famille d'agents actifs pouvant être testée comme agents thérapeutiques dans les modèles souris KO pour *Gdi-1*.

CHAPITRE II

Matériels et méthodes

Résultats

Matériels et méthodes

Souches de nématodes

Les nématodes ont été cultivés selon les méthodes standards (Brenner 1974). La souche Bristol N2 a été utilisée comme animal de type sauvage. Les souches de nématodes contenant les allèles suivantes nous ont été fournies par le centre de génétique *Caenorhabditis* (CGC) qui est subventionné par NIH National Center for Research Resources (NCRR): *mel-11 (sb56)* et la souche transgénique contenant la construction *bls1 [vit-2 ::GFP + rol-6(su1006)]*. (Une liste plus exhaustive d'allèles est énumérée dans l'article au chapitre III)

Traitement ARNi

La construction *pL4440-dest-gdi-1* utilisée pour soumettre les animaux à l'ARNi contre *gdi-1*, est une gracieuseté de Dr Marc Vidal, de l'institut de Cancer Dana-Farber. La construction *pL4440-dest-egfp* a été générée telle que décrit précédemment (Caruso, Jenna et al. 2008). L'ARNi *egfp* a été utilisé comme contrôle dans toutes les expériences, sauf lorsque précisé. Ces constructions ont été transformées dans la souche de bactérie HT115 (DE3) (Timmons, Court et al. 2001) et les animaux ont été soumis au traitement ARNi comme préalablement décrit (Caruso, Jenna et al. 2008).

Observation de l'endocytose des lipoprotéines yolk

L'observation a été effectuée sur des animaux adultes depuis 1 jour, traités à l'ARNi contre *gdi-1*. Étant donné que nous observons des protéines GFP nous n'avons pas utilisé l'ARNi *egfp* comme contrôle mais plutôt les bactéries HT115 (DE3) utilisé pour produire les bactéries ARNi. Les images fluorescentes ont été capturées par la caméra Leica DFC350FX R2 et les logiciels de la série AF6000 de Leica.

Marquage au BrdU

Des bactéries *Escherichia coli* ont été marquée au BrdU telle que décrit précédemment (Crittenden, Leonhard et al. 2006). Les animaux adultes depuis 2 jours traités à l'ARNi ont été nourrit avec les bactéries marquées au BrdU pendant 30 minutes. Les gonades de ces animaux ont été disséquées dans la solution tampon M9. Les gonades ont ensuite subit un traitement HCl pendant 1h, puis au PBS pour 15 minutes et blocage avec du sérum de lapin 10% pour 30 minutes. Suivi d'une incubation avec l'anticorps primaire anti-BrdU (1 :1000 mAB G3G4; Developmental Studies Hybridoma Bank) pendant la nuit, à 4°C, et d'une incubation avec l'anticorps secondaire de rhodamine (1 :100 Jackson ImmunoResearch) pendant 1 h. les lamelles sont ensuite montées avec une solution de mowiol. Les images fluorescentes ont été capturées par la caméra Leica DFC350FX R2 et les logiciels de la série AF6000 de Leica.

Observation de la morphologie des oocytes

L'observation a été effectuée sur des animaux adultes depuis 1 jour, traités à l'ARNi *gdi-1* ou *egfp*. Les images proviennent de la microscopie DIC (Differential interference contrast). Les images ont été capturées par la caméra Leica DFC350FX R2 et les logiciels de la série AF6000 de Leica.

Résultats

Caractérisation phénotypique des nématodes *gdi-1* (ARNi)

Étant donné que chez les mammifères il y a deux gènes *GDII*, codant pour α et β GDI, il est probable que β GDI peut compenser le manque d' α GDI. Alors que chez *C. elegans* il n'y a qu'un gène pour Rabgdi, soit *gdi-1*. Ce gène est un proche homologue de *GDII* (valeur BLAST : 2.10E-158). La souris *Gdi-1* est viable et fertile et ne présente pas d'altération morphologique ou neurologique visible (D'Adamo, Welzl et al. 2002), alors que nous montrons ici que chez *C. elegans*, *gdi-1* (ARNi) provoque une forte stérilité. En effet, nous pouvons voir à la figure 3 de l'article au chapitre III que l'ARNi contre *gdi-1* provoque les phénotypes de stérilité (Ste), d'anomalie au niveau de la gonadogenèse (Gon), des oocytes endomitotiques (Emo) et un défaut de contraction de la gonade lors de l'ovulation. Nous pouvons aussi y voir que les phénotypes Ste, Gon et Emo sont grandement diminués dans la souche *rrf-1(pk1417)* présentant une résistance des cellules somatique (mais non germinales) à l'ARNi, alors que l'expressivité de ces phénotypes n'est pas significativement altérée dans les mutants *ppw-1(pk2505)* présentant une résistance à l'ARNi dans les cellules germinales. Ceci suggère que la fertilité des nématodes nécessite la fonction de *gdi-1* davantage dans les cellules somatiques que dans les cellules germinales. Voici donc trois expériences supplémentaires que nous avons effectuées afin d'en savoir plus sur le système reproducteur de *gdi-1* (ARNi).

Voici d'abord un aperçu du système reproducteur hermaphrodite de *C. elegans* (Figure 2.1).

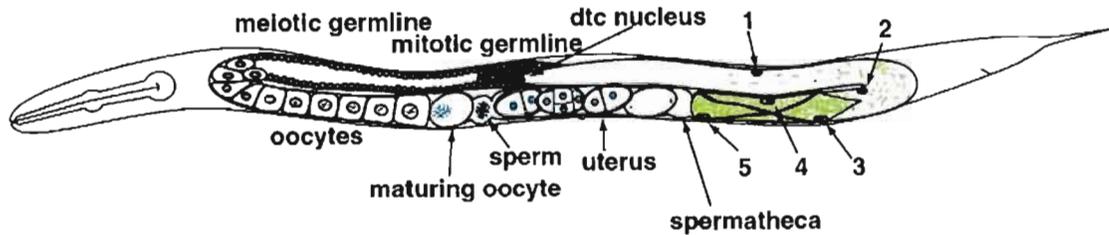


Figure 2.1 Système reproducteur de l'hermaphrodite *C. elegans*. Les cellules myoépithéliales de la gaine de la gonade sont numérotées. La partie distale correspond aux DTCs (*distal tips cells*) et la partie proximale représente l'utérus. Les cellules germinales (« germline ») prolifèrent et se développent en oocytes. Après l'ovulation, les oocytes continuent leur parcours dans l'utérus en tant qu'embryons, qui deviennent ensuite des œufs. Tiré de (Hubbard and Greenstein 2000).

La gonadogenèse chez *C. elegans*, phénotypes Gon et Tum

À la naissance, la gonade des larves contient 4 cellules : Z2 et Z3 sont les précurseurs des cellules germinales, alors que Z1 et Z4 sont les précurseurs de la partie somatique de la gonade, c'est à dire les DTCs, la gaine, la spermathèque et l'utérus (Hubbard and Greenstein 2000) (Figure 2.2). La gonade a un axe distal-proximal qui correspond au développement des cellules germinales vers la partie proximale où ultimement les embryons sont pondus (Figure 2.1). Les DTCs provoquent la mitose (et/ou inhibe la méiose) des cellules germinales distales via le récepteur GLP-1 (récepteur de la famille Notch). Les cellules germinales proximales entrent en prophase de la méiose (Hubbard and Greenstein 2000). L'activation constitutive de GLP-1 chez le mutant *glp-1 (oz112)* crée le phénotype Tum, où les cellules germinales se divisent constamment et n'entrent jamais en méiose (Berry, Westlund et al. 1997) (Figure 2.3).

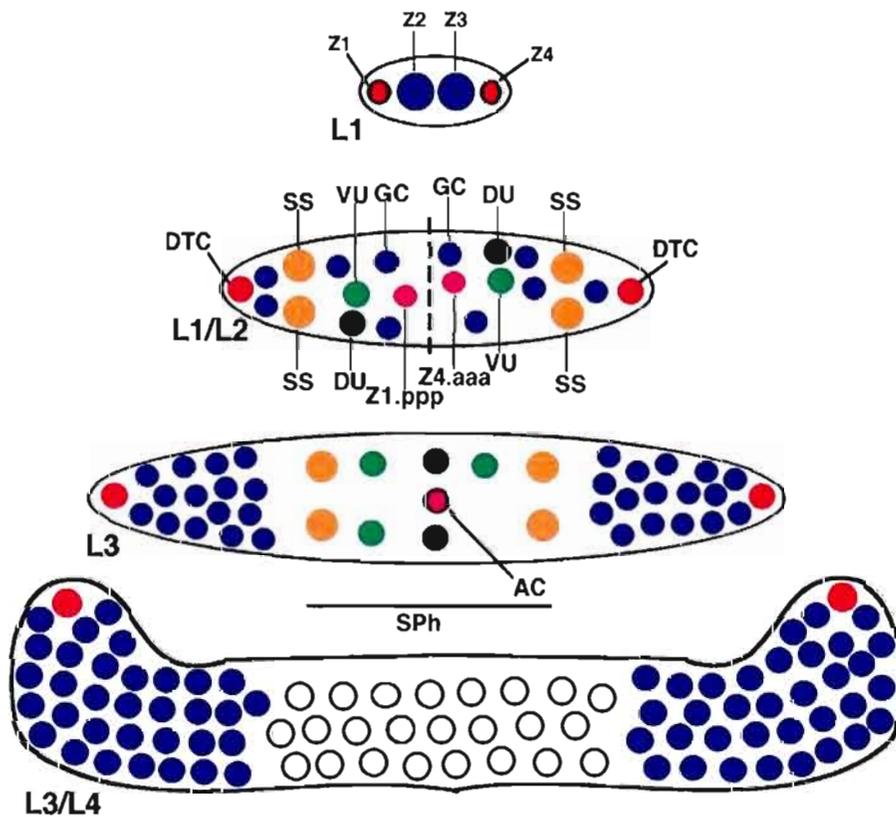


Figure 2.2 Développement de la gonade selon les différents stades larvaires (L1 à L4). Z2 et Z3 sont les précurseurs des cellules germinales, alors que Z1 et Z4 sont les précurseurs de la partie somatique de la gonade, c'est à dire les DTCs (*distal tips cells*), la gaine, la spermathèque et l'utérus. Tiré de (Hubbard and Greenstein 2000).

Dans chaque bras de la gonade, il y a 5 cellules de la gaine de la gonade. Il s'agit de cellules myoépithéliales allongées situées entre la couche basale lamina de la gonade et les cellules germinales (Hubbard and Greenstein 2000). Les cellules proximales 3 à 5 de la gaine contiennent des filaments fins et épais qui contractent pour provoquer l'ovulation (McCarter, Bartlett et al. 1997). La cellule 5 s'attache directement à la spermathèque (Figure 2.1) (Hubbard and Greenstein 2000). L'élongation de la gonade pour former la forme en « U » est dirigée par les DTCs durant les stades larvaires 3 et 4 (Su, Merz et al. 2000) (Figure 2.2).

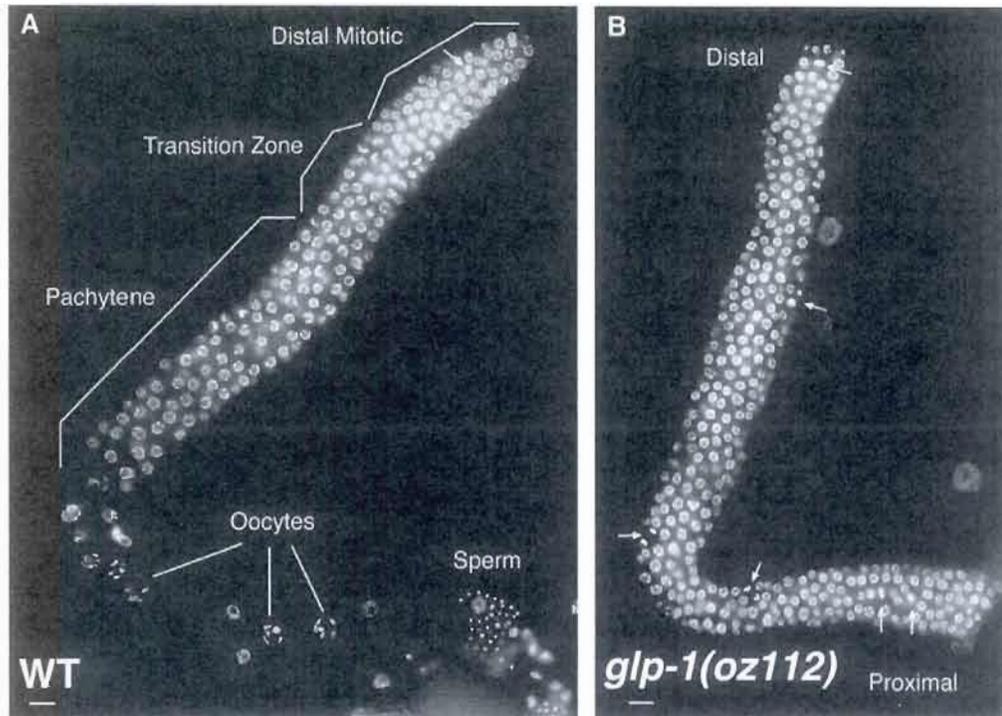


Figure 2.3 Marquage des noyaux des cellules germinales de la gonade et phénotype Tum. (A) Gonade du type sauvage. Les cellules germinales entrent en méiose dans la zone de transition. Elles sont arrêtées en prophase I de la méiose au stade pachytène et compléteront la maturation méiotique seulement dans la partie proximale. (B) Phénotype Tum chez le mutant gain de fonction *glp-1*. Il y a davantage de cellules en mitose (flèches) dans la partie proximale de la gonade chez le mutant que dans le type sauvage. Tiré de (Hubbard and Greenstein 2000).

Plusieurs études sur les mécanismes de migration des DTCs ont été réalisées chez *C. elegans* afin de mieux comprendre les différents phénomènes qui permettent l'organogénèse et la migration neuronale. La Figure 2.4 illustre la forme de la gonade chez le sauvage ainsi que chez certains mutants ayant des altérations de migration des DTCs (Su, Merz et al. 2000).

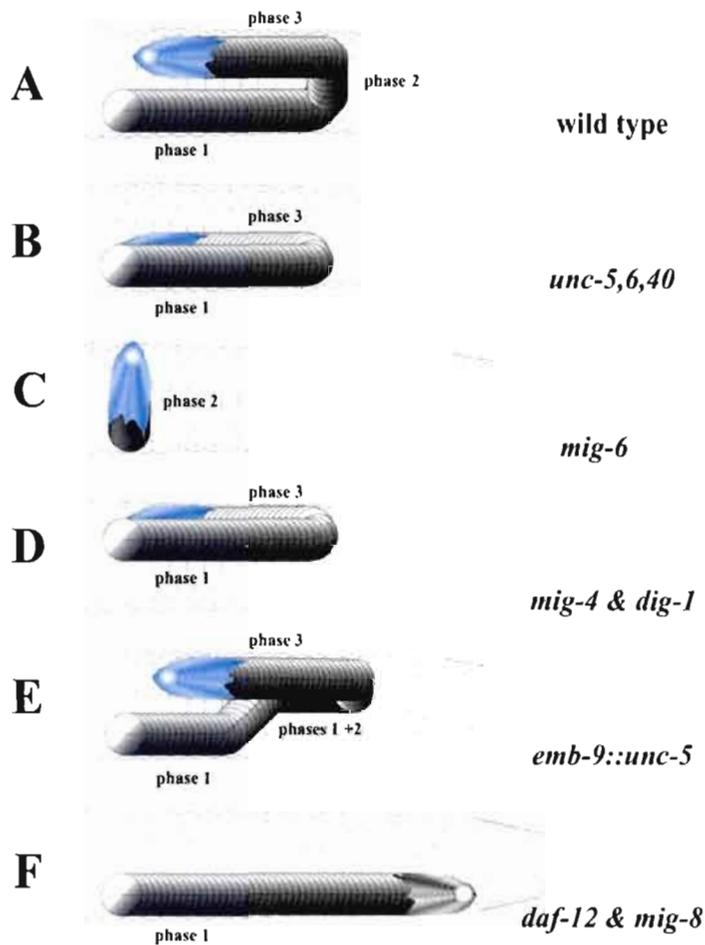


Figure 2.4 Forme de la gonade du type sauvage (A) et de certains mutants (B à F), qui ont une altération de migration. Tiré de (Su, Merz et al. 2000).

Le phénotype Gon correspond à une anomalie dans la morphologie des gonades. GON-1 est une métalloprotéase qui dégraderait la matrice extracellulaire, permettant ainsi la migration des DTCs (Hesselson, Newman et al. 2004). Le ligand UNC-6 et ses récepteurs UNC-5 et UNC-40 jouent un rôle important dans les changements de direction des DTCs (Su, Merz et al. 2000). *unc-6* fait partie de la famille des netrines qui dirigent la migration des cellules et des neurones lors du développement (Moore, Tessier-Lavigne et al. 2007).

Cependant, un raccourcissement des gonades pourrait aussi provenir d'une inhibition de la prolifération des cellules germinales. Le contrôle de la prolifération des cellules germinales dans la partie distale de la gonade et leur passage en méiose est contrôlé par le récepteur *glp-1* qui fait partie de la famille des récepteurs NOTCH et dont la fonctionnalité dépend de divers processus de trafic membranaire (Kopan and Ilagan 2009). Afin d'identifier l'effet de *gdi-1* (ARNi), nous avons marqué les nématodes au bromodeoxyuridine (BrdU). Le BrdU est un analogue de la thymidine et permet de visualiser les cellules en mitose, suite à une coloration à l'anticorps anti-BrdU (Crittenden, Leonhard et al. 2006). La Figure 2.5 montre qu'il n'y a pas particulièrement de différence entre la coloration au BrdU des animaux sauvage et les animaux *gdi-1* (ARNi) car dans les deux cas il a des cellules en mitose seulement dans la partie très distale de la gonade, ce qui est normal. Donc ces résultats montrent que l'altération de *gdi-1* n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules germinales.

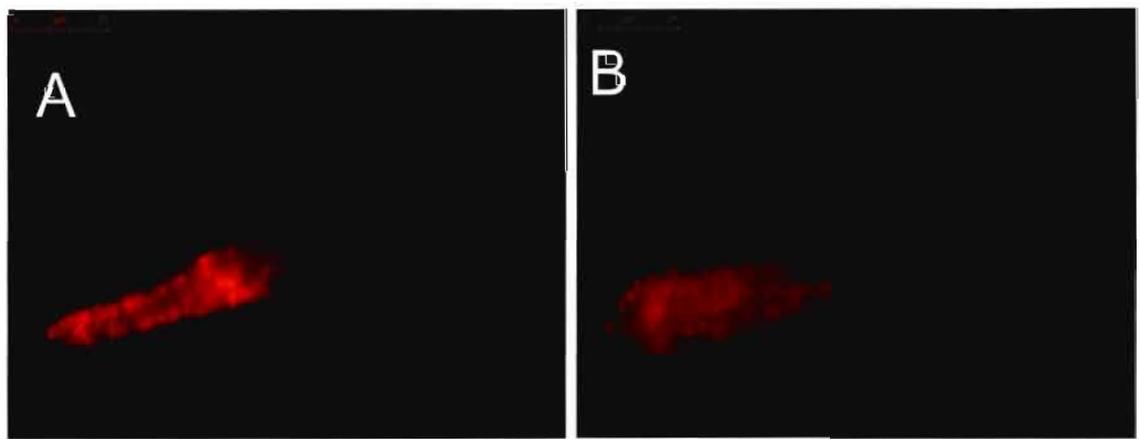


Figure 2.5 Coloration à l'anti-BrdU des gonades (partie distale) disséquées du type sauvage N2 *egfp* (ARNi) (a) et de *gdi-1* (ARNi) (b). Le BrdU sert à marquer les cellules en mitose (n=5).

Maturation des oocytes et ovulation chez *C. elegans*, phénotype Emo

Une fois que les cellules germinales ont commencé la méiose, la voie de signalisation RAS/MAP kinase doit être activée pour sortir du stade pachytène de la méiose I. (Figure 2.3 A) Cette voie pourrait être activée par les DTCs et les cellules de la gaine de la gonade. Les oocytes grossissent pendant qu'ils sont maintenus en stade diakinèse (McCarter, Bartlett et al. 1997). Lors de la maturation méiotique, l'enveloppe du noyau de l'oocyte proximale se défait et il y a une réorganisation importante de la composition de la membrane plasmique de l'oocyte, une internalisation des particules lipoprotéiques yolk, la sécrétion de récepteurs membranaires et de membranes riches en cholestérols (Iwasaki, McCarter et al. 1996) (Grant and Hirsh 1999) (Sato, Sato et al. 2006). Pour que les oocytes matures entrent dans la spermathèque afin d'y être fertilisées, il doit y avoir contraction des cellules de la gaine de la gonade et une dilatation de la spermathèque. Ce processus est appelé ovulation (McCarter, Bartlett et al. 1997). La maturation méiotique doit être coordonnée avec l'ovulation. Pour atteindre cette coordination, des signaux intercellulaires contrôlent la maturation méiotique (Miller, Ruest et al. 2003). Par exemple, le spermatozoïde utilise la protéine MSP (*major sperm protein*) en tant qu'hormone pour provoquer à distance la maturation méiotique et la contraction de la gaine de la gonade (McCarter, Bartlett et al. 1999). Après l'ovulation, les oocytes continuent leur parcours dans l'utérus en tant qu'embryons, qui deviennent ensuite des œufs. Les mutations qui engendrent des problèmes d'ovulation causent le phénotype Emo («Endomitotic oocytes»). Ce phénotype survient lorsqu'il y a plusieurs cycles de réplication d'ADN sans qu'il y ait de cytokinèse, l'oocyte devient alors grandement polyploïde (Iwasaki, McCarter et al. 1996) (Ono and Ono 2004).

***gdi-1* et la régulation d'un membre de la famille des récepteurs LDLs**

Au niveau germinale, l'endocytose du yolk (lipoprotéine essentielle au développement de l'embryon) joue un rôle dans la maturation de l'oocyte. Cette endocytose se fait d'une façon clathrine dépendante via le récepteur RME-2 (receptor-mediate endocytosis) et est régulée par RAB-5. RME-2 est un récepteur de la famille des « low-density lipoprotein » (LDL) (Grant and Hirsh 1999). Nous avons observé l'endocytose du yolk chez *gdi-1* (ARNi) car, ainsi que décrit plus haut, l'endocytose du yolk dans l'oocyte joue un rôle important dans la maturation des oocytes et nous voulions savoir si une diminution d'endocytose du yolk pourrait être à l'origine du phénotype Emo. L'apport en yolk dans l'oocyte est observable grâce au transgénique YP170-GFP. Le mutant RME-2 montre une déficience d'endocytose du yolk ainsi que le phénotype Emo (Grant and Hirsh 1999). Les phénotypes observés pour *rab-5* (ARNi) sont une accumulation de YP170-GFP dans l'espace pseudocoelomique et intercellulaire ainsi qu'une diminution de l'accumulation de YP170-GFP dans les oocytes et les embryons (Grant and Hirsh 1999). Nous montrons ici que *gdi-1* (ARNi) provoque aussi une accumulation de YP170-GFP dans l'espace pseudocoelomique et intercellulaire due à une diminution de son internalisation dans les oocytes (Figure 2.6). Les mutants *rme-2* (*b1005*, *b1008*, *b1026*) ne sont pas complètement stérile, avec une production embryonnaire moyenne de 78 comparée à environ 300 pour le type sauvage (Grant and Hirsh 1999). Alors que *gdi-1*(ARNi) montre une stérilité plus élevée que *rme-2* (voir la figure 3 de l'article au chapitre III), ce qui montre que la stérilité due au RNAi contre *gdi-1* n'est pas exclusivement lié à un défaut d'endocytose du yolk.

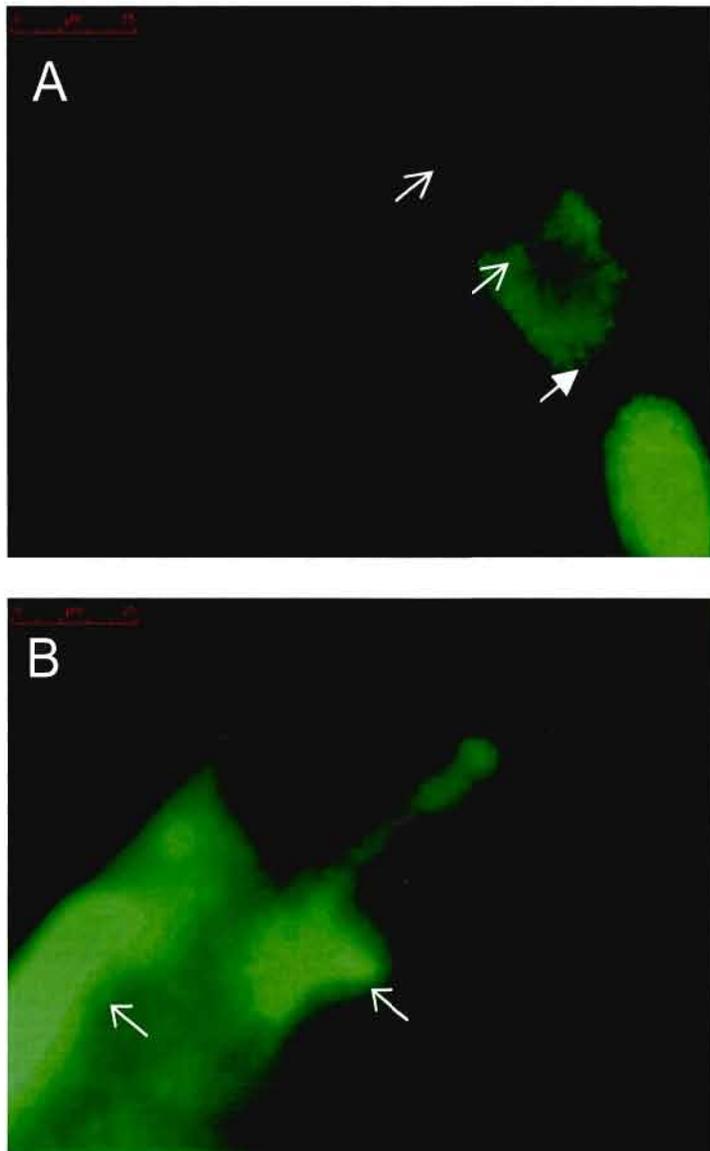


Figure 2.6 *gdi-1* (ARNi) provoque une accumulation de YP170-GFP dans l'espace pseudocoelomique et intercellulaire, selon des micrographies fluorescentes d'oocytes dans la partie proximale de la gonade type sauvage N2 (ARNi *egfp*) (A) et d'animal *gdi-1* (ARNi) (B). (A) Le plus développé des oocytes (flèche pleine) du sauvage est rempli de vésicules contenant du YP170-GFP, tandis que les deux oocytes moins développés en contiennent moins (flèches). (B) chez *gdi-1* (ARNi), il y a une accumulation de YP170-GFP dans l'espace pseudocoelomique et intercellulaire (flèches) (n>30).

***gdi-1* (ARNi) provoque un défaut de morphologie des oocytes matures**

La microscopie DIC nous a permis d'observer des anomalies dans la morphologie des oocytes chez *gdi-1* (ARNi). Lors de la maturation méiotique, l'oocyte subi un réarrangement cortical impliquant le cytosquelette. Ce réarrangement transforme l'oocyte d'une forme angulaire à une forme ovoïde, et ce, 3 minutes avant l'ovulation (McCarter, Bartlett et al. 1997). Nous avons observé qu'il y avait davantage d'oocytes en forme ovoïde chez *gdi-1* (ARNi) que normalement, une altération de leur taille ainsi qu'une désorganisation des oocytes matures (ovoïdes) au niveau de la gonade proximale. (Figure 2.7) Ce résultat nous porte à croire que *gdi-1* aurait un rôle à jouer dans ce réarrangement du cytosquelette et/ou entrainerait une maturation précoce des oocytes.

Une autre possibilité est que le phénotype d'accumulation d'oocytes en formes ovoïdes soit causé par un défaut au niveau de la sécrétion de récepteur yolk à la membrane plasmique. Rappelons d'abord que les mutants pour le récepteur yolk (RME-2) ainsi que l'ARNi contre *rab-5* sont défectueux au niveau de l'endocytose du yolk (Grant and Hirsh 1999). Cependant, lorsque ces auteurs ont fait un traitement d'ARNi contre les gènes impliqués dans la sécrétion, il y avait non seulement une accumulation de YP170-GFP à l'extérieur des oocytes, mais il y avait aussi le phénotype Emo et une accumulation d'oocytes en formes ovoïdes (Grant and Hirsh 1999). Étant donné que *gdi-1* (ARNi) montre aussi ces trois phénotypes, il est probable que *gdi-1* soit important pour la sécrétion de protéines à la surface de la membrane plasmique, tel que le récepteur yolk. Par contre, cela ne veut pas dire que le défaut d'accumulation de YP170-GFP dans l'oocyte par *gdi-1* (ARNi) soit uniquement causé par un défaut de sécrétion et non par un défaut d'endocytose. Car pour les gènes impliqués dans l'endocytose ainsi que dans la sécrétion, comme c'est le cas pour *gdi-1*, les défauts de sécrétion masqueraient les défauts d'endocytose (Grant and Hirsh 1999). Reste maintenant à déterminer si la forme ovoïde des

oocytes chez *gdi-1* (ARNi) est causé par un défaut de trafic des membranes ou par un défaut au niveau du cytosquelette, tel que mentionné plus haut.

Les résultats de ce chapitre nous indiquent que *gdi-1* ne contrôlerait pas la prolifération des cellules germinales, puisque la zone mitotique des gonades des animaux *gdi-1* (ARNi) est de taille normale. Par contre, *gdi-1* jouerait un rôle important dans les mécanismes de maturation des oocytes, impliquant une modification importante de la morphologie de ces derniers et le contrôle de l'endocytose des particules yolk.

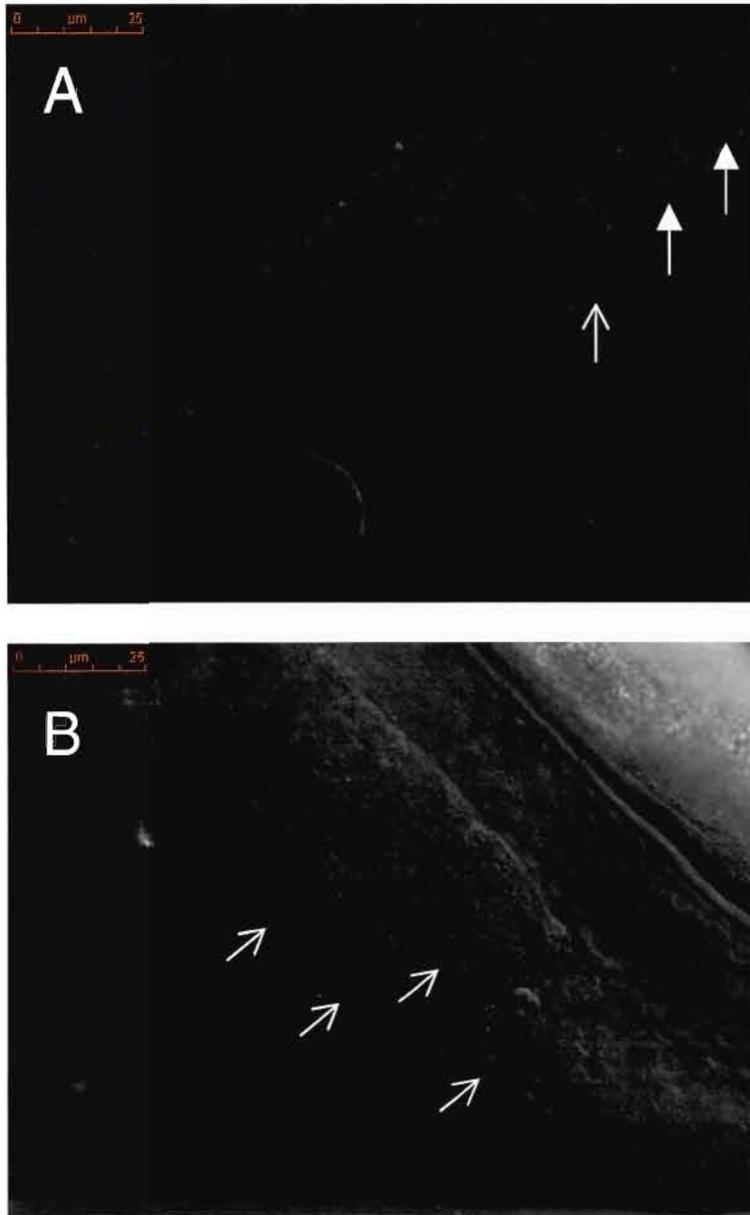


Figure 2.7 Anomalie de morphologie des oocytes chez *gdi-1* (ARNi). Microscopie DIC du système reproducteur du type sauvage N2 (ARNi *egfp*) (a) et de *gdi-1* (ARNi) (b). Il y a davantage d'oocytes en forme ovoïde (flèches) chez *gdi-1* (ARNi) (b) que normalement dans la souche sauvage (a). Les flèches pleines représentent la forme angulaire (N>7).

CHAPITRE III

Article scientifique :

Searching for Signaling Balance through the Identification of Genetic Interactors of the Rab Guanine-nucleotide Dissociation Inhibitor *gdi-1*

L'article a été publié par la revue Plos One le 14 mai 2010

www.plosone.org

Contribution des auteur(e)s

Il y a deux grandes parties à l'article. D'une part, il y a la partie bioinformatique faite par Anna Lee, étudiante au doctorat sous une co-direction constituée de Sarah Jenna (UQAM) et de Michael Hallett (McGill). D'autre part, il y a la validation biologique du prédicteur d'interactions génétiques faite par Richard Perreault sous la direction de Sarah Jenna. Les figures 1 et 2 ont été faites selon les résultats d'Anna Lee alors que les figures 3 à 6 ont été faites selon les résultats de Richard Perreault.

Voici la contribution des différent(e)s auteur(e)s concernant la partie validation biologique et les figures 3 à 6 de l'article :

- La planification des expérimentations s'est faite par Sarah Jenna et Richard Perreault.
- Les expérimentations et l'obtention des résultats ont été faits en grande majorité par Richard Perreault, aidé à l'occasion de Sarah Jenna.
- Les figures 3 et 6a ont été faites par Richard Perreault, la figure 4 par Richard Perreault et Sarah Jenna, et les figures 5 et 6c par Sarah Jenna et/ou Anna Lee.
- L'interprétation des résultats s'est fait par Richard Perreault, aidé de Sarah Jenna et d'Anna Lee.
- Les analyses statistiques ont été faites par Richard Perreault, Sarah Jenna et Anna Lee.
- Au niveau de la rédaction, Richard Perreault a écrit les légendes des figures 3 à 6, aidé de Sarah Jenna. Il a également écrit les sections suivantes de la partie matériel et méthodes, aidé de Sarah Jenna :
 - *Nematode strains*
 - *RNAi and drug treatment*
 - *Mesurement of sheath cell contraction*
- Le reste du texte a été écrit par Sarah Jenna.

Searching for Signaling Balance through the Identification of Genetic Interactors of the Rab Guanine-Nucleotide Dissociation Inhibitor *gdi-1*

Anna Y. Lee^{1,2,3}, Richard Perreault^{4,3}, Sharon Harel⁴, Elodie L. Boulier⁴, Matthew Suderman¹, Michael Hallett^{1,2,3}, Sarah Jenna^{4,5,6*}

1 McGill Centre for Bioinformatics, McGill University, Montréal, Québec, Canada, **2** School of Computer Science, McGill University, Montréal, Québec, Canada, **3** Rosalind and Morris Goodman Cancer Centre, McGill University, Montréal, Québec, Canada, **4** Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, **5** Pharmaqam, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, **6** Biomed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada

Abstract

Background: The symptoms of numerous diseases result from genetic mutations that disrupt the homeostasis maintained by the appropriate integration of signaling gene activities. The relationships between signaling genes suggest avenues through which homeostasis can be restored and disease symptoms subsequently reduced. Specifically, disease symptoms caused by loss-of-function mutations in a particular gene may be reduced by concomitant perturbations in genes with antagonistic activities.

Methodology/Principal Findings: Here we use network-neighborhood analyses to predict genetic interactions in *Caenorhabditis elegans* towards mapping antagonisms and synergisms between genes in an animal model. Most of the predicted interactions are novel, and the experimental validation establishes that our approach provides a gain in accuracy compared to previous efforts. In particular, we identified genetic interactors of *gdi-1*, the orthologue of *GDI1*, a gene associated with mental retardation in human. Interestingly, some *gdi-1* interactors have human orthologues with known neurological functions, and upon validation of the interactions in mammalian systems, these orthologues would be potential therapeutic targets for *GDI1*-associated neurological disorders. We also observed the conservation of a *gdi-1* interaction between different cellular systems in *C. elegans*, suggesting the involvement of *GDI1* in human muscle degeneration.

Conclusions/Significance: We developed a novel predictor of genetic interactions that may have the ability to significantly streamline the identification of therapeutic targets for monogenic disorders involving genes conserved between human and *C. elegans*.

Citation: Lee AY, Perreault R, Harel S, Boulier EL, Suderman M, et al. (2010) Searching for Signaling Balance through the Identification of Genetic Interactors of the Rab Guanine-Nucleotide Dissociation Inhibitor *gdi-1*. PLoS ONE 5(5): e10624. doi:10.1371/journal.pone.0010624

Editor: Jörg Hoheisel, Deutsches Krebsforschungszentrum, Germany

Received: October 2, 2009; **Accepted:** March 22, 2010; **Published:** May 13, 2010

Copyright: © 2010 Lee et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC, <http://www.nserc-crsng.gc.ca>) of Canada and the Canada Foundation for Innovation (<http://www.innovation.ca>). S.J. is funded by the Canada Research Chair program (<http://www.chairs-chaire.gc.ca>). A.Y.L. and S.H. are funded by the NSERC, and R.P. by the Fonds de la recherche en santé du Québec (<http://www.frsq.gouv.qc.ca>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jenna.sarah@uqam.ca

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Many biological mechanisms depend on a state of signaling homeostasis maintained by the appropriate integration of the synergistic and antagonistic activities of signaling genes [1]. Accordingly, the symptoms of numerous diseases result from genetic mutations that disrupt this homeostasis [2–5]. The relationships between signaling genes suggest avenues through which homeostasis can be restored and disease symptoms subsequently reduced. Specifically, disruptions caused by loss-of-function mutations in a particular gene may be compensated by concomitant perturbations in genes with antagonistic activities.

Antagonisms and synergisms between genes can be identified via genetic interactions. A genetic interaction between two genes

exists when the phenotypic effect of a perturbation (e.g. mutation, RNAi treatment, drug targeting) in one gene is dependent upon a perturbation in the other gene. Thus, disease symptoms caused by mutations in a given gene may be compensated by perturbing genetic interactors of the gene. That is, the genetic interactors are potential therapeutic targets. Therefore, the identification of genetic interactions is an important step towards the development of treatments for monogenic disorders.

The nematode *Caenorhabditis elegans* is an ideal animal model for identifying genetic interactions due its genetic tractability. Furthermore, the high degree of conservation of molecular pathways related to human diseases has facilitated the dissection of physiopathological mechanisms of genetic disorders including Duchenne Muscular Dystrophy (DMD; OMIM: 310200), lyso-

somal storage disorders, obesity, diabetes and Huntington's disease [6–8]. Although the extent to which genetic interactions are conserved between *C. elegans* and human is unknown, previous studies encourage the use of *C. elegans* towards the identification of therapeutic targets for human diseases. For example, a genome-wide RNAi suppressor screen in a *C. elegans* model of type 2 diabetes, i.e. a strain with a loss-of-function mutation in the *C. elegans* insulin-like growth factor receptor *daf-2*, led to the identification of a kinase that exhibits antagonistic activity towards *daf-2*. Interestingly, mice with the kinase knocked-out appeared to be protected against diabetes, suggesting that the antagonistic interaction identified in *C. elegans* led to the identification of a potential therapeutic target for a human disease [8]. The application of systematic screens for other diseases hinges on the development of high-throughput techniques enabling the quantification of relevant phenotypes. However, the development of such quantitative techniques is in general time-consuming and may be extremely challenging. An alternative approach involves the *in silico* prediction of genetic interactions [9–11]. Interestingly, the rate at which genetic interactions are identified with prediction-driven screens appears to be significantly greater than the rate for systematic experimental screens (Figure 1). This suggests that *in silico* prediction represents an efficient approach to identifying genetic interactions.

All existing *in silico* approaches for predicting genetic interactions use several types of data including gene expression measurements and protein-protein (PP) interactions.

Lec and colleagues developed a method for predicting whether two given genes have a shared function [9]. The method is based on the weighted integration of gene pair data and was trained with pairs of genes that share functional annotations as positive learning examples. The predictions can be used in turn to infer genetic interactions, since pairs of genes that share function tend to exhibit synergistic interactions. Moreover, known antagonists of a given gene can be used as so-called seeds to search for other antagonists of the gene; specifically, genes predicted to share function with the seeds are inferred to be antagonists as well. However, many genes that share a function do not synergistically interact with each other nor do they antagonize the same gene(s), and therefore the accuracy of this approach for predicting genetic interactions may be limited (see the validation success rate in Figure 1).

Zhong and Sternberg developed a method to directly predict genetic interactions [10]. This method is also based on the weighted integration of gene pair data, but was trained with known genetic and PP interactions as positive learning examples. However, the method predicts a set of genetic interactions that involves only a small portion of all *C. elegans* genes (~8% of the genome, see Figure 1). This may be due to the amount of data specific to a given gene pair that is required to make a prediction, since such data is scarce for many gene pairs.

Chipman and Singh developed an approach for predicting synergistic interactions only [11]. This approach uses information gained from the contexts of genes in a biological network that integrates several types of data (e.g. an edge exists between two genes if they encode proteins that exhibit a PP interaction), specifically by using the proximity between genes in the network. While this approach appears extremely powerful based on the *in silico* validation results, it remains to be determined how well this approach performs according to experimental validation.

Since all experimentally validated approaches for predicting genetic interactions currently suffer from limited accuracy or predict genetic interaction sets with limited genome coverage, we developed a novel *in silico* approach that uses statistical analyses of gene/protein neighborhoods in biological networks (Figure 2). Unlike previous

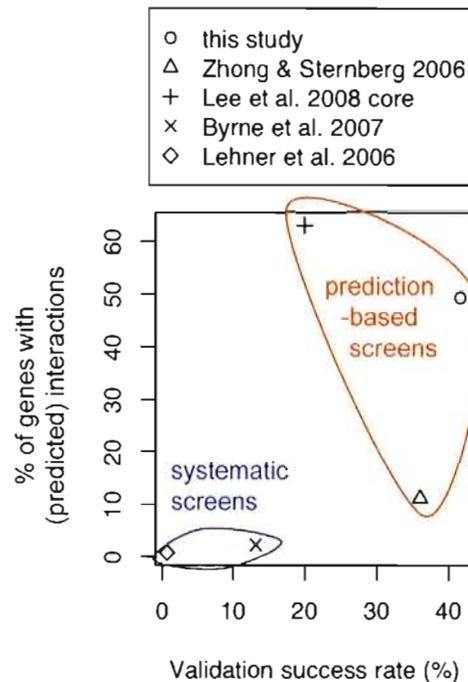


Figure 1. Comparison of large-scale genetic interaction studies in *C. elegans*. The studies are compared in terms of the percentage of genes with identified/predicted interactions and the success rate of experimental validation (i.e. the fraction of tested gene pairs that exhibit a genetic interaction). Systematic experimental screens test a limited number of gene pairs due to the labor-intensive experimental procedures. Moreover, these screens identify a small number of interactions relative to the number of tested gene pairs since genetic interactions appear to be rare. Prediction-based methods can assess all pairs of genes *in silico*, and consequently, the percentage of genes with predicted interactions tends to be larger than the percentage of genes with interactions identified by a systematic experimental screen. Moreover, predictions focus experimental efforts on gene pairs that are likely to exhibit a genetic interaction. Accordingly, the success rates of prediction-driven screens tend to be greater than the rates for systematic experimental screens. The success rate of our study shown here is conservative since it was computed based on the following definition: a gene pair exhibits an interaction only if the interaction is statistically significant according to all considered epistasis models (see Methods). doi:10.1371/journal.pone.0010624.g001

approaches, the prediction of a genetic interaction between two given genes is aided by analyses that detect common features of the neighborhoods of the genes, or their encoded proteins (e.g. common PP interactors of the proteins). Furthermore, our approach does not require 'seeds' for every gene of interest to predict novel antagonistic interactions, unlike the Lec *et al.* approach [9], and while our approach appears comparable to the Zhong and Sternberg approach [10] in terms of specificity, our set of predicted genetic interactions has greater genome coverage (Figure 1).

The overall aim of this study was to identify genetic interactions in *C. elegans* that warrant further study in mammals towards the identification of promising therapeutic targets for genetic diseases. We thus used our approach to identify genetic interactors of the Rab-specific guanine-nucleotide dissociation inhibitor *gdi-1* (WormBase: WBGene00001558) which shares 80% protein sequence identity with *GDI1* (Ensembl: ENSG00000203879; Blast E-value: 2.10×10^{-158}), a gene associated with non-syndromic forms of mental retardation in human (OMIM: 300104) [5]. *GDI1* encodes *GDI* α , a major regulator of Rab GTPase activity during

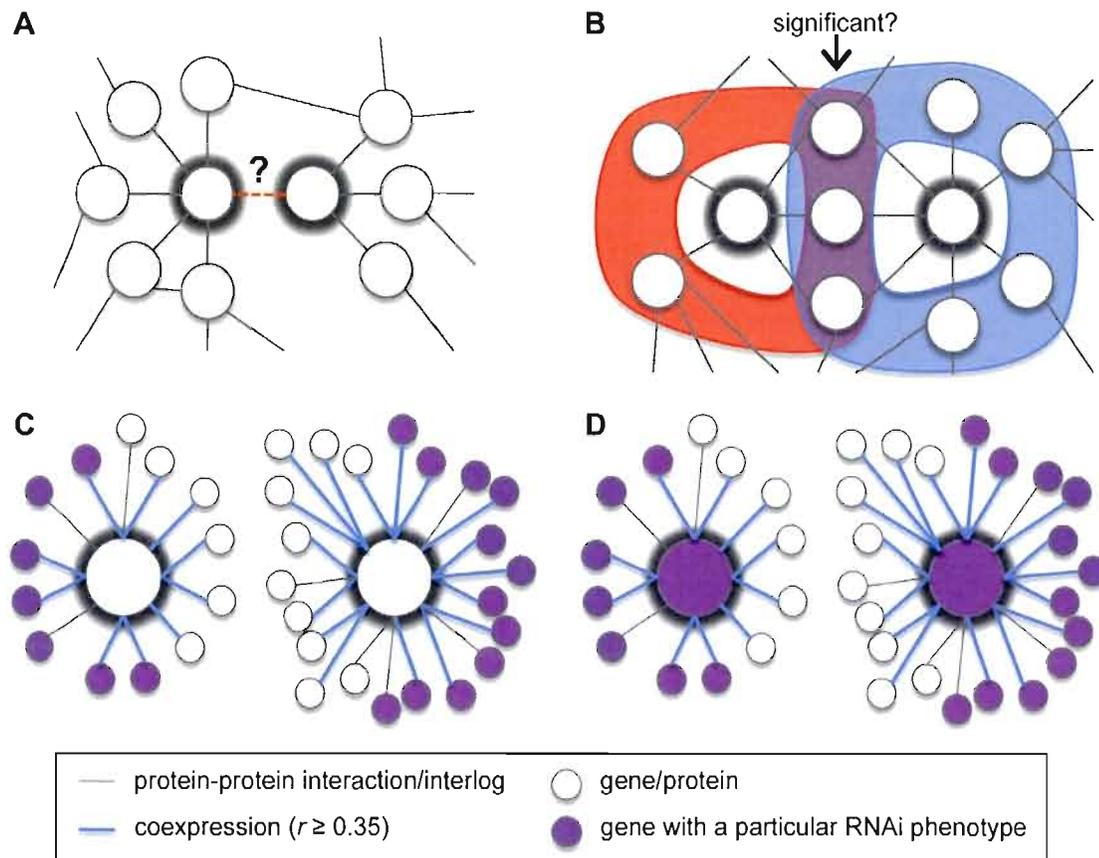


Figure 2. Gene pair attributes used to predict genetic interactions. The two genes/proteins of interest are highlighted with thick grey rings. (A) *I*, the presence or absence of a protein-protein (PP) interaction between the proteins encoded by the genes of interest, or their orthologues. (B) *Cl*, a measure of the significance of the overlap between the PP interaction neighborhoods of the proteins encoded by the genes of interest (i.e. overlap of the red and blue regions). The PP interaction neighborhood of a given protein is the set of all of proteins that exhibit a PP interaction with the given protein (according to the multi-species PP interaction network). (C) *N*, an indicator for whether the neighborhoods of the genes of interest are enriched with the same phenotype. Here we define the neighborhood of a given gene as the set of genes that show significant coexpression ($P \leq 0.05$, see Methods) with the given gene and/or encode proteins that exhibit a PP interaction with the product of the given gene (according to the multi-species PP interaction network). Both neighborhoods shown here are enriched with a particular phenotype. (D) *NPh*, an indicator like *N* with the additional requirement that the genes of interest themselves must also exhibit the phenotype enriched in their neighborhoods.

doi:10.1371/journal.pone.0010624.g002

endocytosis and exocytosis [5,12]. This protein is thus a critical regulator of cell signaling events. The validation of predicted genetic interactions of *gdi-1* identified several antagonists. If these genetic interactions are conserved in the relevant human disease system, they would suggest therapeutic targets for *GDII*-associated cognitive disorders. In addition, our results suggest the conservation of a subset of genetic interactions across different cellular systems in *C. elegans*, and the involvement of *GDII* in human myopathies resulting from mutations in components of the Dystrophin Glycoprotein Complex (DGC).

Results

The predictor of genetic interactions in *C. elegans*

We developed a predictor of genetic interactions using a learning set that contains positive and negative examples of interactions from the literature (see Table S1 for the manually-curated interactions) and gene pairs randomly selected from the *C. elegans* genome, respectively (see Methods). Since it is estimated that the vast majority of gene pairs do not genetically interact [13],

a set of randomly selected gene pairs is expected to be enriched with true negative examples.

Our predictor uses gene expression measurements, RNAi knockdown phenotype observations and PP interactions from multiple species to measure the likelihood of a genetic interaction. The gene expression measurements were obtained from DNA microarray results [14], and the phenotype observations were obtained from genome-wide RNAi experiment results (see Methods). A multi-species PP interaction network was constructed with *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens* and *Saccharomyces cerevisiae* PP interactions identified by yeast two-hybrid (obtained from BioGRID and [15,16]). PP interactions from species other than *C. elegans* were incorporated using InParanoid orthology maps [17]. For any two given genes, we considered a measure of their coexpression (*Exp*), a measure of their phenotype similarity (*Ph*) and an indicator of a PP interaction between their encoded proteins or orthologues (*I*) as gene pair attributes that might help determine whether the given genes genetically interact. Variants of the *Exp*, *Ph* and *I* attributes have been used by existing predictors of genetic interactions [9,10].

Importantly, our approach is the first to use particular features of biological networks in order to improve the accuracy of the prediction of genetic interactions. For example, considering the multi-species PP interaction network, we define the neighborhood of a protein as the set of proteins that exhibit a PP interaction with it (possibly via orthology). Although two given proteins may not be known to exhibit a PP interaction, their neighborhoods may contain a surprising number of common PP interactors (Figure 2B). We defined a gene pair attribute based on the encoded proteins of the two genes of interest, measuring the significance of their number of common PP interactors (CI). The set of gene pairs that encode proteins with significantly many common PP interactors ($CI \leq 0.05$) is enriched with gene pairs that are known to genetically interact ($P = 6.67 \times 10^{-39}$, hypergeometric test).

We also investigated whether a biological network that integrates observations of phenotype similarity, coexpression and PP interaction can improve the prediction of genetic interactions. We defined a novel biological network called the PhEP network, where nodes represent genes and the genes are labeled with their RNAi knockdown phenotypes. Two genes are connected by an edge if they are significantly coexpressed and/or if they encode or have orthologous proteins that exhibit a PP interaction (see Methods). Although a phenotype observation may be absent for the gene itself, such observations may be available for several of its neighbors (i.e. the genes connected to the gene of interest by one edge) in the PhEP network. We therefore defined a gene pair attribute indicating the enrichment of genes associated with some phenotype in the neighborhoods of both genes of interest, in the PhEP network (N , see Figure 2C). We demonstrated that the set of gene pairs with such neighborhood characteristics is enriched with gene pairs that are known to genetically interact ($P = 1.20 \times 10^{-215}$, hypergeometric test). By the same line of reasoning, we defined a variant of this gene pair attribute, NPh , indicating that the two genes of interest are annotated with the phenotype that is enriched in both of their neighborhoods in the PhEP network (see Figure 2D). Again, the set of gene pairs with such neighborhood characteristics is enriched with gene pairs that genetically interact ($P = 6.26 \times 10^{-113}$, hypergeometric test).

Taken together, we showed that our network-based attributes (CI , N and NPh) of gene pairs are significantly associated with genetic interactions, suggesting that these attributes may facilitate the accurate prediction of genetic interactions.

Ultimately, the Exp , Ph , I , CI , N , and NPh attribute values of a given gene pair are integrated by a logistic regression model that outputs a prediction score between 0 and 1 representing the likelihood of a genetic interaction between the two genes (see Methods).

We performed leave-one-out cross-validation to evaluate the predictor at different score thresholds (Figure S1). We determined that a conservative threshold of 0.975 induces error rates comparable to those achieved by the Zhong and Sternberg (ZS) genetic interaction predictor (Table S2). However, this threshold also induces a set of predicted genetic interactions that is 98% novel when compared to the prediction sets of previous studies [9,10], and roughly three-fold more genes are present in our set compared to the ZS set. Thus, under conditions where our predictor and the ZS predictor have comparable accuracy estimates, our set of predicted interactions exhibits greater genome coverage. We chose 0.85 as our definitive threshold since it yields an estimated false positive rate (Table S2) close to the expected rate of finding a genetic interaction at random (0.5%) [13], coinciding with our negative learning set of random gene pairs. At this threshold, the estimated true positive rate is 10.8% (Table S2). Although our predictor misses many true positive interactions,

over 800K genetic interactions are predicted and again, 98% of them are novel (Figure S2A). In particular, our predictor proposes more interactions per gene on average compared to the ZS predictor (Figure S2B). In addition, roughly four-fold more genes are present in our set of predicted interactions compared to the ZS set (Figure S2B). Thus, when the predictor has an estimated false positive rate that is appropriately low, the corresponding set of predicted interactions also exhibits a large increase in genome coverage compared to the ZS set. Genome-wide genetic interactions predicted by our method are available online (<http://www.mcb.mcgill.ca/~anna/gInterWorm/search.php>).

The biological relevance of the predicted genetic interaction network was assessed *in silico* using pathway annotations ([18] and Table S3). Previous studies show that genetic interactions occur within and between pathways, although between-pathway interactions are more prevalent amongst interactions identified in large-scale studies [19–21]. Therefore, we investigated the connectivity of pairs of genes annotated to the same pathway, in the predicted network (see Methods). We found that a significant fraction of these pathway gene pairs are directly connected ($P = 10^{-5}$, Figure 3A), indicating predicted interactions within pathways. We also found that a significant fraction of pathway gene pairs are connected through shared neighbors ($P = 10^{-5}$, Figure 3B), and in most cases, at least one of the shared neighbors is not in the same pathway as the pair (98% and 99% of the cases for all and just signaling pathways, respectively). These cases indicate predicted interactions that likely occur between pathways, or within a pathway if the shared neighbor is an unknown member of the pathway of the pair. Interestingly, we predict significantly many genetic interactions within and between pathways mapped from human to *C. elegans*, as we do for pathways derived directly from *C. elegans* (compare “all pathways” to “signaling pathways” in Figure 3). Taken together, the connectivity of pathway genes in the predicted network is consistent with connectivity observations based on genetic interactions identified experimentally [19–21], even for pathway genes mapped from human, and thus supports the validity of our predictor.

The set of predicted genetic interactions exhibits improved coverage of genes conserved between human and *C. elegans*

We investigated whether more genes conserved between human and *C. elegans* are present in our set of predicted genetic interactions when compared to other prediction sets. When all prediction sets are restricted to genes with human orthologues (see Text S1), it is still true that a large fraction of our set is novel (Figure S2A). We thus examined the level of characterization of human genes with *C. elegans* orthologues present in prediction sets. Our analysis shows that *in silico* methods tend to predict genetic interactions involving well-characterized genes more often than poorly-characterized genes (Figure S2C). All human genes with *C. elegans* orthologues only present in the ZS prediction set have a high level of characterization (gene characterization index > 5 [22]). Interestingly, 25% of human genes with *C. elegans* orthologues only present in our prediction set do not have a high level of characterization. Taken together, our approach predicts a large number of novel genetic interactions for genes conserved between *C. elegans* and human, and also predicts interactions for genes orthologous to poorly-characterized human genes that have no predicted interactions by other approaches.

In order to better understand why our method predicts genetic interactions that are mostly novel, we investigated the genes with human orthologues associated with mental retardation and synaptic plasticity (MRSP) that we curated from the literature (Table S4).

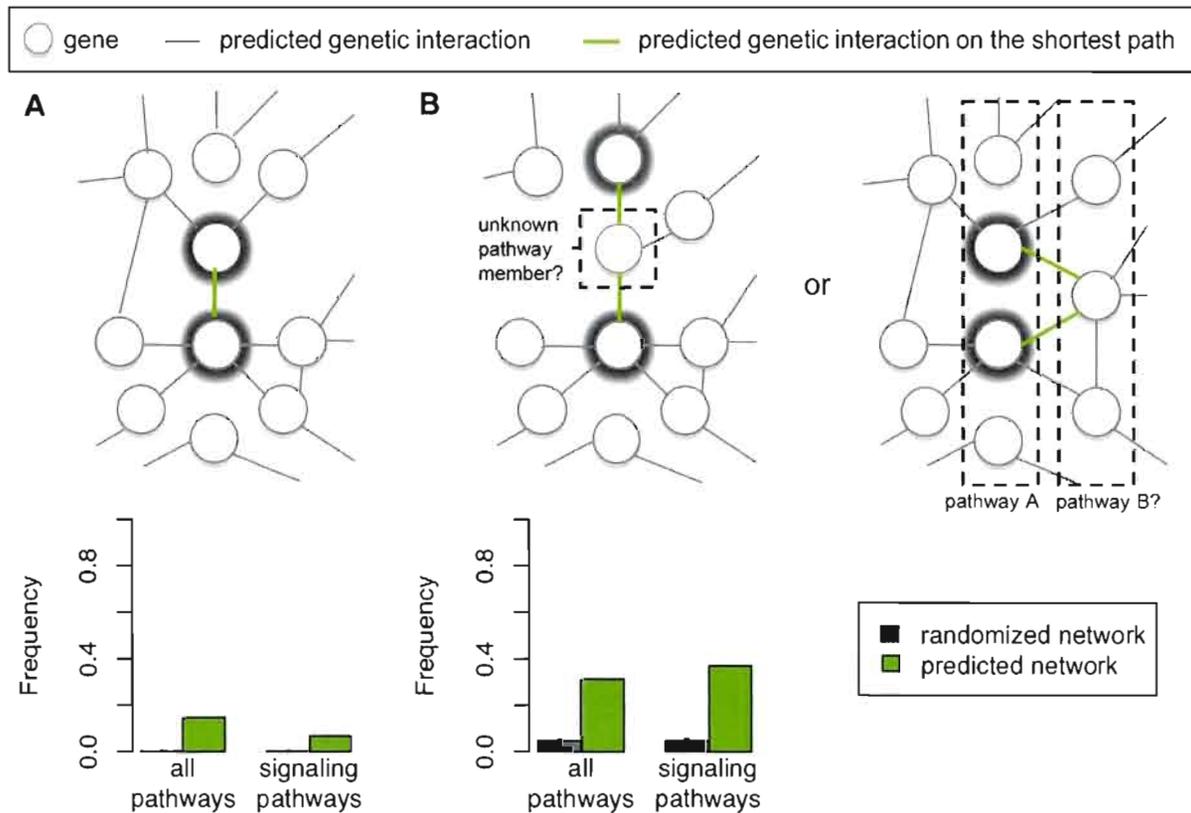


Figure 3. Assessment of the biological relevance of the predicted genetic interaction network with pathway annotations. Here we show scenarios where a pair of genes annotated to the same pathway (A) is directly connected or (B) shares ≥ 1 neighbor in a genetic interaction network, where the gene pair of interest is highlighted with thick grey rings. In (A), the genes exhibit a within-pathway genetic interaction based on the given set of pathway annotations. In (B), the genes belonging to the same pathway (e.g. pathway A) both interact with a gene that may either be an unknown member of the same pathway (within pathway interaction), or may belong to a different pathway (e.g. pathway B, between-pathway interactions). Below, the frequencies at which each scenario occurs in the predicted network and in randomized networks are shown with respect to all pathways and to signaling pathways only (see Methods). The “all pathways” and signaling pathway annotations were derived from human and *C. elegans* experimental data respectively. For each set of pathway annotations, the median, first and third quartile frequencies of each scenario were computed across $N=100K$ randomized networks; the bar length depicts the median and the error bars depict the first and third quartiles. Both scenarios occur more frequently than what is expected by chance, for both sets of pathway annotations.
doi:10.1371/journal.pone.0010624.g003

Over two-fold more MRSP genes are present in our set of predicted genetic interactions compared to the ZS set (89% and 40% of the genes, respectively). In examining the MRSP genes that are present in our set only, we found that these genes are generally associated with more information with our approach than with the ZS approach (see Figure S3A and the Methods). In particular, the additional information comes from our novel network-based attributes (e.g. the *CI* and *N* attributes). The values of these attributes are computable for nearly all MRSP genes, but the values of most ZS attributes are computable only for a smaller subset of the genes (Figure S3B). These results suggest that the network-based attributes facilitate the prediction of novel interactions.

A large number of human genes associated with disease are conserved in *C. elegans* [23]. For example, *GDI1*, a human gene associated with mental retardation [5], has high sequence similarity (Blast E-value: 2.10×10^{-158}) to *gdi-1*, a *C. elegans* gene that has yet to be functionally characterized. Since *GDI1* is involved in neurotransmission and has been associated with cognitive deficiency in human [5,12], it is functionally related to our set of human MRSP genes (Table S4). We thus investigated whether the relationship between *GDI1* and MRSP genes is conserved between human and *C. elegans*.

Interestingly, our method predicts that *gdi-1* genetically interacts more frequently with MRSP genes than with other genes ($P=1.1 \times 10^{-5}$, two proportion test), and it also shares genetic interaction partners more frequently with MRSP genes than with other genes ($P=1.1 \times 10^{-50}$, two proportion test). These results provide statistically significant evidence that the interactions between *GDI1* and its potential neurological partners are conserved in *C. elegans*.

Validation of predicted genetic interactors of *gdi-1*

We identified phenotypes that result from treating *C. elegans* animals with *gdi-1(RNAi)*. These phenotypes include sterility (Ste, Figure 4C), a gonad morphogenesis defect characterized by a shortening of gonads (Gon, Figure 4A,C), an ovulation defect characterized by an accumulation of endomitotic oocytes (Emo, Figure 4B,C), and a severe reduction of sheath cell contraction (Figure 4D). We showed that *gdi-1* controls ovulation and gonad morphogenesis processes by modulating somatic gonad cell functions. That is, *rff-1(pk1417)* (WormBasc: WBGen00004508) animals, which are resistant to RNAi in somatic cells, expressed significantly reduced levels of the phenotypes when subjected to *gdi-1(RNAi)* compared to wild-type and mutant animals resistant to

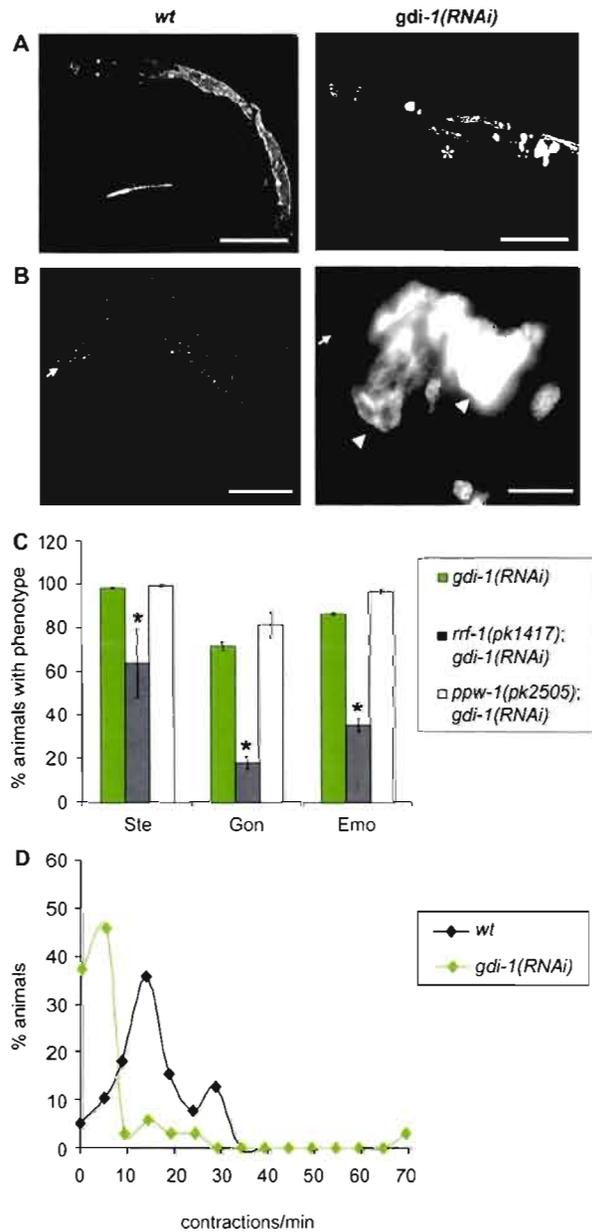


Figure 4. Phenotypic characterization of *gdi-1(RNAi)*-treated animals. (A,B) DAPI staining of *egfp(RNAi)*- (labeled wt) and *gdi-1(RNAi)*-treated wild-type animals. (A) Gonad morphogenesis defects (Gon) characterized by short gonads (*) are observed in *gdi-1(RNAi)*-treated animals. Scale bar, 200 μ m. (B) Accumulation of Endomitotic oocytes (Emo, arrowheads) in the proximal gonad of *gdi-1(RNAi)*-treated animals. Arrows indicate the spermathecae. Scale bar, 25 μ m. (C) Sterility (Ste), Gon and Emo phenotypes were measured in wild-type, *rrf-1(pk1417)* and *ppw-1(pk2505)* animals submitted to *gdi-1(RNAi)* ($N=3$). The mean expressivity/penetrance of each phenotype is shown with error bars representing \pm one standard error. A (*) indicates a statistically significant reduction of the phenotypes ($P \leq 0.05$, Student's *t*-test) compared to wild-type animals treated with *gdi-1(RNAi)*. (D) Distributions of the sheath cell contraction frequency for *egfp(RNAi)*- (labeled wt) and *gdi-1(RNAi)*-treated animals. doi:10.1371/journal.pone.0010624.g004

RNAi in germinal cells (see *gdi-1(RNAi)* and *ppw-1(pk2505)* (WormBase: WBGene00004508); *gdi-1(RNAi)* respectively in Figure 4C). These results suggest that *gdi-1* is a critical regulator of signaling pathways controlling reproductive functions in *C. elegans*.

To experimentally validate our predictions, we examined 18 strains containing mutations in 12 genes predicted to genetically interact with *gdi-1*. Ste, Emo and Gon phenotypes were measured for mutant and wild-type animals submitted to RNAi against *gdi-1* or the negative control, *egfp* (Figure 5A). Epistasis analyses of these measurements were performed using three commonly used statistical models [24,25] to identify significant genetic interactions (see Tables S5 and S6 for the estimated epistasis coefficients and *P* values, respectively). We also applied a statistical test that measures the suppression of *gdi-1(RNAi)*-induced phenotypes (see Methods). Our results show only partial agreement between the different models of epistasis (Figure 6A). The most stringent requirement (i.e. significant interaction by all applicable tests, $P \leq 0.05$) resulted in a validation success rate of 42%, while more permissive analysis (i.e. significant interaction by at least one test) increased the success rate to 67%. This represents an 84- or 134-fold improvement over the expected success rate from random genetic screening. Although validation success rates depend on the selected bait gene(s) (e.g. *gdi-1* in our study), our success rates surpass those reported for existing methods [9,10] (Figure 1A), thus suggesting that our method represents an important improvement in predictive accuracy.

Of the 12 putative genetic interactions tested, five were successfully validated according to all statistical tests used to analyse our results. All five interactions are antagonistic, and the genes that antagonize *gdi-1* are the following: *unc-96* (WormBase: WBGene00006825), encoding a paramyosin-binding protein [26]; *unc-89* (WormBase: WBGene00006820), encoding a titin-like myosin light chain (MLC)-specific kinase [27]; *tra-4* (WormBase: WBGene00018740), a close orthologue of the human proto-oncoprotein and transcriptional repressor *PLZF* (Ensembl: ENSG00000109906) [28]; *aspm-1* (WormBase: WBGene00008107), the closest orthologue of the mammalian *ASPM* (Ensembl: ENSG0000066279), a gene associated with mitotic spindle assembly and microcephaly [29,30]; and *dyb-1* (WormBase: WBGene00001115), the closest orthologue of dystrobrevin (Ensembl: ENSG00000134769), a component of the DGC in human [31].

Notably, we showed genetic interactions between *gdi-1* and regulators of the actin-myosin contractile apparatus. Indeed, *gdi-1*-associated phenotypes were reduced by a mutation in the MLC-specific kinase (MLCK) *unc-89*, while *gdi-1(RNAi)* phenocopies a mutation in the MLC-specific phosphatase *mel-11* (WormBase: WBGene00003196; Figure 5A). This suggests that *gdi-1* antagonizes MLC phosphorylation and consequently, contraction through the actin-myosin apparatus during gonad morphogenesis. Consistent with these results, *gdi-1*-associated phenotypes were reduced by a chemical inhibitor of MLCK (ML-7) and a chemical inhibitor of myosin II ATPase activity (blebbistatin) (Figures 5B and 6).

We also identified a genetic interaction between *gdi-1* and *dyb-1* that affects gonad morphogenesis (Figures 5A and 6). The latter gene is a close orthologue of dystrobrevin, a component of the DGC that when altered leads to myopathies [32]. Moreover, dystrobrevin is a functional partner of dystrophin (Ensembl ENSG00000198947), a protein that is associated with DMD and mild cognitive deficiencies in human [32]. *C. elegans* is a model organism used to dissect the molecular mechanism of myopathy associated with mutations in the DGC components *dyb-1* and *dys-1* (WormBase: WBGene00001131, the orthologue of dystrophin) [33]. As shown previously, mutations in *dyb-1* and *dys-1* produce a progressive myopathy when combined with a weak allele of *hll-1* (WormBase: WBGene00001948; compare panels A and B of Figure 7) [34,35]. We showed that *gdi-1(RNAi)* treatment significantly reduces muscle degeneration in *dyb-1(cx36);hll-1(cc561)* and *dys-1(cx18);hll-1(cc561)* mutants (Figure 7C). Therefore, we demonstrated that the antagonism between *gdi-1* and *dyb-1* is conserved in different cellular systems in *C. elegans*.

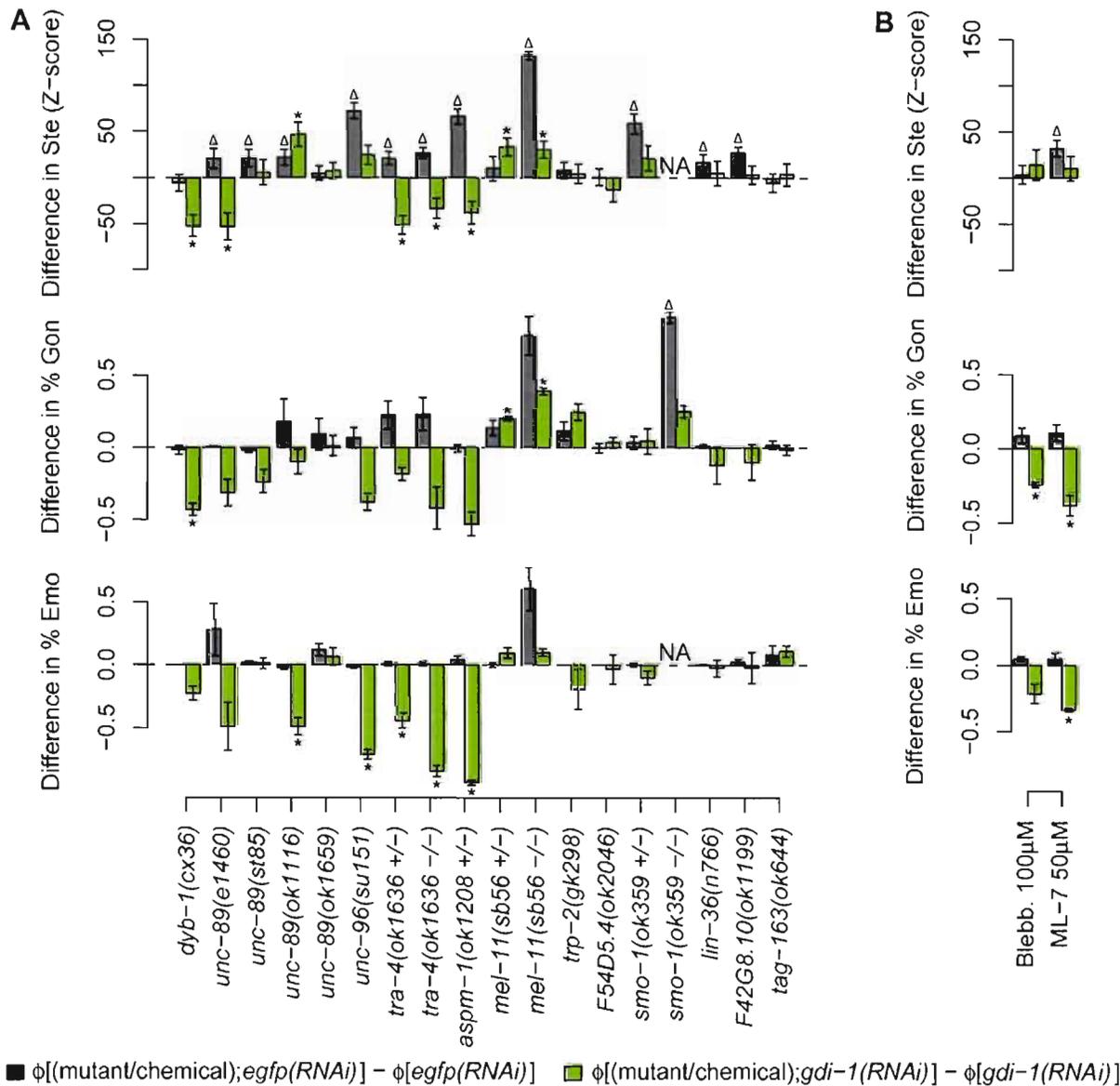


Figure 5. Validation of a subset of genetic interactions predicted for *gdi-1*. Ste, Gon and Emo phenotypes were measured in animals submitted to RNAi against *egfp* (grey) or *gdi-1* (green). The mean difference in the expressivity/penetrance of each phenotype in perturbed (mutant or chemically treated) versus wild-type (wt) animals (denoted $\phi[x] - \phi[y]$, for animals of type x and y) is shown with error bars representing \pm one standard error, $N \geq 3$. For Ste, the Z-score of the difference in expressivity is plotted (see Text S1). (Δ) and (*) indicate statistically significantly differences for animals treated with *egfp*(RNAi) and *gdi-1*(RNAi), respectively ($P \leq 0.05$, see Methods). NA: not available. (A) Differences in phenotype expressivity induced by mutations in genes predicted to interact with *gdi-1*. (B) Differences in phenotype expressivity induced by chemical treatment. Blebbistatin (Blebb.) is a myosin ATPase inhibitor and ML-7 is a specific inhibitor of myosin light-chain kinase. doi:10.1371/journal.pone.0010624.g005

Taken together, our experimental results identified genes that antagonize *gdi-1* activity during gonad morphogenesis, ovulation (Figure 6B), and muscle degeneration.

Discussion

We present a prediction-based approach to identifying genetic interactions in *C. elegans*. The approach predicts many novel interactions, including interactions for poorly-characterized genes. Our validation results for *gdi-1* suggest that our predictions identify true interactions with a success rate far beyond random genetic screening (i.e. at least 84-fold greater than the rate of

identifying true interactions by chance), and that our approach has improved accuracy compared to previous approaches. Moreover, we identified five genes with antagonistic activities towards *gdi-1* activity during gonad morphogenesis and/or ovulation, including genes associated with phosphorylated MLCs and *dyb-1*. Interestingly, we also showed that the antagonism between *gdi-1* and *dyb-1* influences muscle cell morphology.

Our predictor integrates novel attributes based on network analysis. We showed that each network-based attribute identifies gene pairs that are enriched for true genetic interactions. The common interactors (CI) attribute is based on the common PP interactors of the proteins encoded by the two genes of interest, in

A

Gene/ Drug	Allele	Ste				Gon				Emo			
		M	+	*	S	M	+	*	S	M	+	*	S
<i>dyb-1</i>	<i>cx36</i>												
	<i>e1460</i>												
<i>unc-89</i>	<i>st85</i>												
	<i>ok1116</i>												
	<i>ok1659</i>												
<i>unc-96</i>	<i>su151</i>												
<i>tra-4</i>	<i>ok1636 +/-</i>												
	<i>ok1636 -/-</i>												
<i>aspm-1</i>	<i>ok1208 +/-</i>												
	<i>ok1208 -/-</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>mel-11</i>	<i>sb56 +/-</i>												
	<i>sb56 -/-</i>												
<i>trp-2</i>	<i>gk298</i>												
<i>F54D5.4</i>	<i>ok2046</i>												
<i>smo-1</i>	<i>ok359 +/-</i>												
	<i>ok359 -/-</i>	N	N	N	N					N	N	N	N
<i>lin-36</i>	<i>n766</i>												
<i>F42G8.10</i>	<i>ok1199</i>												
<i>tag-163</i>	<i>ok644</i>												
Blebb.													
ML-7													

B Blebbistatin ML-7

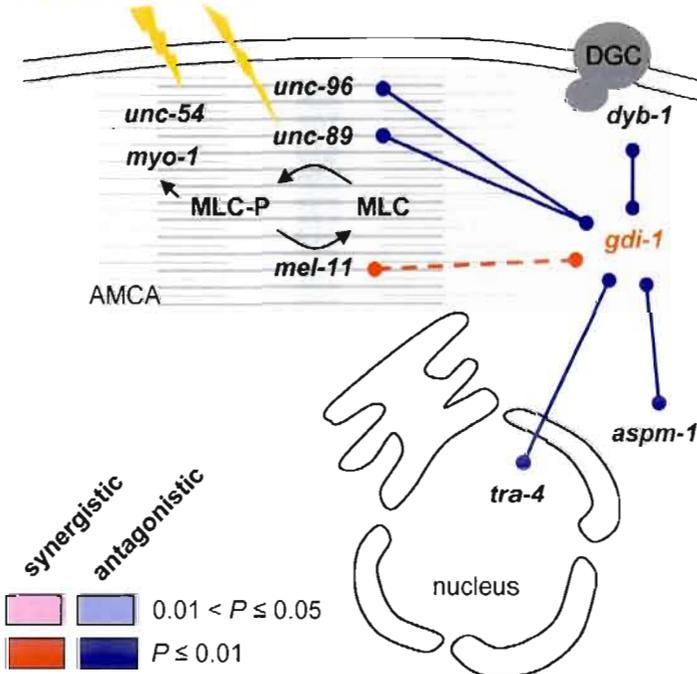


Figure 6. Epistasis between *gdi-1* and its predicted genetic interactors and chemical suppressors. (A) The minimum (M), additive (+) and multiplicative (*) statistical models of epistasis were used in the analysis. A statistical test for the specific suppression (S) of *gdi-1(RNAi)*-induced defects was also used (see Methods for details). Significant synergistic and antagonistic interactions are illustrated with shades of red and blue, respectively ($P \leq 0.05$). Darker shades indicate significant interactions with $P \leq 0.01$. The absence of a statistically significant interaction is indicated by a white entry. NA: not available. (B) Schematic representation of *gdi-1* interactors. Blue lines represent antagonistic interactions with *gdi-1*. The dashed red line indicates phenocopy between *mel-11* and *gdi-1*. *unc-96* (paramyosin-binding protein), *unc-89* [myosin light chain (MLC)-kinase], and *mel-11* (MLC-phosphatase) are regulators of the actin-myosin contractile apparatus (AMCA, represented in grey) [26,72]. *unc-54* and *myo-1* are type II myosin heavy chains. *tra-4* encodes a PLZF-like transcription factor [28]. *aspm-1* (orthologue of mammalian *ASPM*) and *dyb-1* (orthologue of a component of the dystrophin glycoprotein complex, DGC) have been associated with mitotic spindle assembly and DGC function in human, respectively [32]. ML-7 and blebbistatin (Blebb.) are specific inhibitors of MLC-kinase and myosin II ATPase activities, respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0010624.g006

a multi-species PP interaction network. Two given proteins that have surprisingly many common PP interactors may be members of the same complex, thereby increasing the likelihood that their encoding genes genetically interact, since members of the same complex tend to genetically interact [13,36]. Moreover, the *N* and *NPh* attributes are based on shared phenotypes in a so-called PhEP network constructed with RNAi knockdown phenotype, gene expression and PP interaction data. When a specific phenotype is associated with surprisingly many neighbors of a given gene in the PhEP network, it may follow that the gene modulates this phenotype. Thus, if the neighborhoods of two given genes are characterized by the same phenotype(s), the genes may modulate the same phenotype(s), thereby increasing the likelihood that they genetically interact. Furthermore, the network-based attributes provide additional information for less-studied genes, such as genes that may not have been assayed individually (e.g. for phenotype observations) or with other genes systematically (e.g. for PP interactions). For example, no phenotypes have been observed for *unc-89* and it has not been tested for a PP interaction with *gdi-1*. However, the *CI* and *N* attributes support a genetic interaction between *unc-89* and *gdi-1*, which we confirmed experimentally. This suggests that the network-based attributes facilitate the accurate prediction of genetic interactions.

Our analyses suggest that *in silico* approaches tend to predict genetic interactions involving well-characterized genes more often than poorly-characterized genes. The Zhong and Sternberg (ZS) approach explicitly restricts the predictions to genes that satisfy a minimum information requirement (i.e. a gene must be associated with information from at least one attribute that is not the *C. elegans* gene expression attribute) [10]. Only ~50% of all genes satisfy the requirement. As a result, only ~25% of all genes pairs are tested *in silico*. In our approach, we do not impose a minimum information requirement. Moreover, we gained information for ~80% of all gene pairs by integrating our network-based attributes. These features of our approach may be responsible for the large number of novel predicted genetic interactions.

All of the experimentally validated interactions are antagonistic. This suggests that our learning set contains a strong signal for antagonistic interactions and that our approach captures this signal. If this is the case, our approach may be advantageous for predicting antagonistic interactions. Consequently, our approach may also be advantageous for proposing antagonisms that warrant further study in mammals towards the identification of therapeutic targets for monogenic disorders.

Because of its involvement in vesicular trafficking in mammals, *GDI1* may be a critical regulator of several signaling pathways controlling functions such as synaptic plasticity, learning and memory acquisition [5,37,38]. Interestingly, the signaling pathways involving ephrins, integrins and inositol-triphosphate that control gonad morphogenesis and ovulation in *C. elegans* are highly similar to the pathways controlling synaptic plasticity in human [39–44]. Supporting this observation, the anti-epileptic drug valproate, which targets components of these signaling pathways

in human, has been shown to cause severe alteration of sheath cell contraction and ovulation processes in *C. elegans* [45]. Moreover, our data suggest that *gdi-1*, like valproate [45], controls ovulation processes by modulating somatic gonad cell functions. As documented by the Gilbert and Bolker study [46], a conserved signaling pathway can control different cellular processes in different organisms; for example, ovulation in *C. elegans* versus synaptic plasticity in human. However, a signaling pathway that is conserved across different cellular systems and species may have also acquired some context-specific signaling components. We therefore do not expect all signaling pathway observations in one context to apply to another context. However, a number of genes identified as genetic interactors of *gdi-1*, using Ste, Gon and Emo as phenotypical readouts in nematodes, have high sequence similarity to genes with neurological functions in human. These observations support the search for genetic interactors of *gdi-1* with a role in controlling gonad morphogenesis and ovulation in *C. elegans* to suggest likely genetic interactors of *GDI1* controlling cognitive abilities in human. Nevertheless, this strategy for identifying genetic interactions relevant to cognition requires extensive validation in higher organisms such as mouse.

One of the genetic interactions that we uncovered is between *gdi-1* and *aspm-1*. In both *C. elegans* and mammals, *aspm-1* controls mitotic spindle positioning and consequently, the ratio of symmetric and asymmetric cell divisions [29,47]. While control of asymmetric division of somatic gonadal precursor cells (SGPs) is required for the proper morphogenesis of gonads in *C. elegans* [48], it is still unknown whether the modulation of asymmetric division in these cells is at the origin of the interaction between *gdi-1* and *aspm-1*. *aspm-1* is an orthologue of *ASPM*, a gene involved with brain development in human. In particular, *ASPM* is involved in the control of neuronal progenitor proliferation and is associated with microcephaly [47]. Since *GDI1* is expressed in both proliferative and differentiated neurons during brain development [5], it would be interesting to test whether *GDI1* genetically interacts with *ASPM* in mammalian brains and consequently, test if the simultaneous perturbation of both genes would result in a reduction of cognitive disabilities associated with mutations in either *ASPM* or *GDI1* alone.

The molecular origin of the genetic interaction observed between *gdi-1* and *tra-4* is also unknown. The transcriptional repressor *tra-4* was shown to promote female development by repressing male-specific genes in *C. elegans* [28]. This gene was also characterized as a SynMuvB gene because it was shown to negatively regulate *let-60* (WormBase: WBGenc00002335)/Ras-mediated vulval development in nematodes [28]. Interestingly, several SynMuvB genes have been shown to control somatic gonad development [49,50]. Further studies will be required to assess the function of *tra-4* during somatic gonad development and its potential interaction with SynMuvB genes in the cellular context of that process.

We also showed genetic interactions between *gdi-1* and regulators of the actin-myosin contractile apparatus. Indeed, *gdi-*

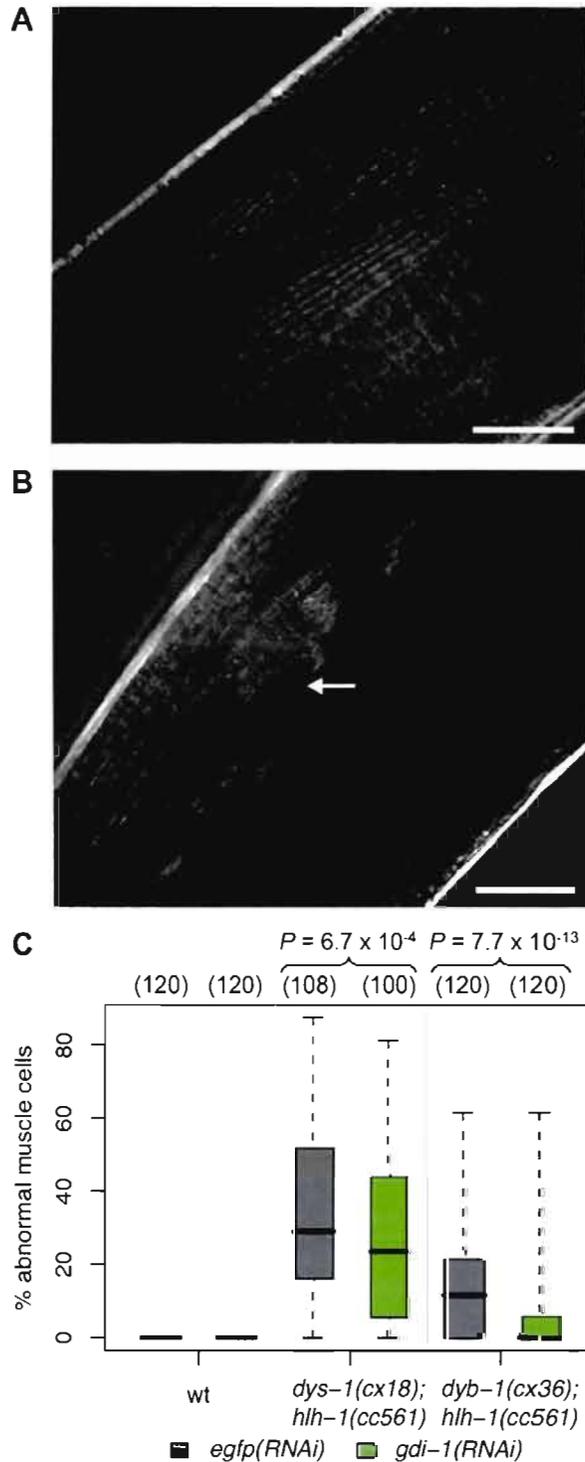


Figure 7. *gdi-1* suppresses *dys-1*- and *dyb-1*-associated muscle degeneration. Body-wall muscle fibers observed using polarized light microscopy in (A) wild-type and (B) *dys-1(cx18);hlh-1(cc561)* animals. The arrow indicates an abnormal/degenerated muscle cell. Scale bar, 200 μ m. (C) Muscle degeneration was assessed in wild-type (wt), *dys-1(cx18);hlh-1(cc561)* and *dyb-1(cx36);hlh-1(cc561)* animals submitted to RNAi against *egfp* (grey) or *gdi-1* (green). The percentage of abnormal muscle cells in a methanol fixed animal, estimated with polarized light microscopy, was used to quantify muscle degeneration in the animal. Boxplots of these percentages are shown. The total number of animals assessed across

three independent experiments is shown above each boxplot in parentheses. The percentage of abnormal muscle cells is significantly reduced in *gdi-1(RNAi)*-treated versus *egfp(RNAi)*-treated mutant animals as indicated by the *P* values shown at the top (see Methods). doi:10.1371/journal.pone.0010624.g007

l-associated phenotypes were reduced by mutations in the MLCK *unc-89* and its functional partner *unc-96* [26]. Interestingly, *unc-96* is required for the proper distribution of *unc-89* at the M-line in body-wall muscle sarcomeres [26]. Our data suggest a partnership between *unc-96* and *unc-89* that promotes the contraction of the actin-myosin contractile apparatus in gonad somatic cells, in a pathway antagonistic to *gdi-1*. This hypothesis is also supported by the significant reduction of *gdi-1(RNAi)*-induced phenotypes in animals treated with the MLCK and myosin II inhibitors ML-7 and blebbistatin, respectively.

Interestingly, MLC phosphorylation and myosin II function have been shown to control synaptogenesis, dendritic spine morphology and synaptic plasticity in mammals [51,52]. Moreover, the inhibition of MLCK function in the lateral amygdala of the mouse brain has been shown to enhance auditory fear conditioning (i.e. learning and memory) and to facilitate synaptic plasticity [53]. Because mutating *GDI1* in mice has the opposite effect [54], it is of interest to assess whether phosphorylated MLC and *GDI1* have antagonistic functions in neurological mechanisms that enable learning and memory acquisition in mammals. If antagonism is present, inhibiting phosphorylated MLC is a potential therapeutic strategy to reduce the symptoms associated with *GDI1* mutations in human.

We also demonstrated that the activity of *gdi-1* is antagonistic with the activity of the dystrobrevin orthologue, *dyb-1*, during gonad morphogenesis in *C. elegans*. Dystroglycan is another component of the DGC and its orthologue *dgn-1* has been previously shown to control gonad morphogenesis in *C. elegans* [55]. Our data suggest that *dyb-1* also contributes to this developmental process. Interestingly, the antagonism between *dyb-1* and *gdi-1* is consistent with the likely antagonism in mammals where dystrobrevin acts as a regulator of cell signaling through the inhibition of receptors and membrane recycling [56], and *GDI1* potentially promotes these cycling events by regulating *RAB4* and *RAB5* [38]. We also showed that this antagonism is conserved in different cellular systems in *C. elegans* since *gdi-1(RNAi)* treatment significantly reduced muscle degeneration in both *dyb-1;hlh-1* and *dys-1;hlh-1* animals. Mechanisms of muscle degeneration resulting from functional alterations of dystrobrevin or dystrophin are still poorly understood in mammals [57]. While *C. elegans* is an animal model of choice to dissect the pathological mechanisms associated with myopathies [58], the antagonisms observed between the *GDI1*, dystrobrevin and dystrophin orthologues in *C. elegans* should be confirmed in DMD mammalian models (e.g. the mdx mouse) before considering *GDI1* as a promising therapeutic target for DMD. Furthermore, since DGC components and *GDI1* are expressed at the synapses of hippocampus neurons [34,38] it would be extremely interesting to test whether perturbations of dystrobrevin function may reduce cognitive disabilities associated with mutations in *GDI1* in mammals.

In summary, we developed a bioinformatics tool to predict genetic interactions in *C. elegans* towards the identification of therapeutic targets to address monogenic disorders associated with disruptions in signaling homeostasis. Our tool uses network-based attributes and our validation suggests that it predicts interactions more comprehensively and with improved accuracy compared to other tools. In addition, we experimentally confirmed the interactions that were predicted between *gdi-1* and several genes involved in neurological functions in human. Notably, we

established that perturbation of *aspm-1*, *tra-4*, *unc-89*, *unc-96*, or *dyb-1* reduces the signaling unbalance resulting from a reduction of *gdi-1* expression. We also showed that a reduction of *gdi-1* expression significantly reduces muscular dystrophy in nematode DMD models. Further studies using relevant mammalian models are required to assess whether *ASPM*, MLC phosphorylation machinery and dystrobrevin would be potent therapeutic targets for cognitive disabilities associated with mutations in *GDII*. Similarly, further studies in mammalian models would be required to assess whether *GDII* would be a potent therapeutic target for DMD. In conclusion, we have developed a valuable tool that facilitates the mapping of genetic interactions in *C. elegans*. Since the conservation of pathogenic mechanisms and genetic interactions between distant species is still under intense debate, experimental validation in mammals of genetic interactions identified in *C. elegans* is required to evaluate the potential of our method to significantly streamline the therapy development process for monogenic disorders that involve genes and signaling pathways conserved between human and *C. elegans*.

Methods

The development and subsequent analysis of the genetic interaction predictor were completed in the R v2.6 statistical computing environment (<http://www.r-project.org>, [59]).

Construction of the learning set

A learning set, comprised of a positive and a negative subset, was constructed for the training of the predictor of genetic interactions. The positive learning set consists of 1,522 genetic interactions identified by automated [60] or manual curation of the literature (see Table S1). The negative learning set should consist of pairs of non-interacting genes. Since the vast majority of gene pairs are believed not to genetically interact [13], we built our negative learning set from ~14,000 randomly selected gene pairs from the set of all genes mapped to a genomic location (WormBase release WS180, <http://www.wormbase.org/>). The approximate 1:10 ratio of positive to negative interactions was established to guarantee a learning set with a thorough sampling of all gene pair combinations (~386 million in total).

Datasets used to derive attributes

The gene expression data was obtained from [14]. We obtained all RNAi knockdown phenotype data in WormBase release WS141 and removed seven uninformative or redundant types, such as “wildtype”, “unclassified”, “not embryonic” and “complex phenotype.” Protein-protein (PP) interactions were obtained from all *C. elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, and *Homo sapiens* yeast two-hybrid datasets stored in BioGRID v2.0.37 (<http://www.thebiogrid.org/>) and from two additional yeast two-hybrid datasets [15,16] that are absent from this database. We focused on yeast two-hybrid datasets because the technique detects an interaction with minimal influence from endogenous environments, e.g. a fly cell. We assume that two proteins do not exhibit a PP interaction if both proteins were assayed and no interaction was found. To create a multi-species PP interaction network, we used the orthology mappings generated by InParanoid v1.35 [17] (non-default parameters: score cutoff 10, in-paralog confidence cutoff 0.025, sequence overlap cutoff 0.2) when run with protein sequences obtained from the InParanoid dataset from June, 2006 (<http://inparanoid.sbc.su.se/cgi-bin/index.cgi>). Comparisons with hand-curated orthologies for a subset of genes indicated that our parameter settings produced orthology mappings with minimal false positive results (data not shown). The names of the genes/

proteins described in the datasets were updated to the names used in WormBase release WS180.

Derivation of attributes for use in the logistic regression

The co-expression attribute $Exp(g, g')$ is the P value derived for the Pearson correlation of genes g and g' across all microarray hybridizations (conditions) relative to the empirically estimated probability distribution of correlation for all gene pairs (i.e. a fitted normal). Figure S4 establishes the need for this estimation due to the lack of fit to standard models of a correlation distribution. Correlations greater than 0.35 are statistically significant ($P \leq 0.05$) according to the estimated distribution. The co-phenotype attribute $Ph(g, g')$ measures the statistical significance of the number of shared phenotypes between the two genes via a standard Fisher's exact test (N = the number of phenotypes observed for at least two genes). We defined the multi-species PP interaction network such that nodes represent *C. elegans* proteins and an edge exists between two proteins if they, or their orthologous proteins in a species considered here, exhibit a PP interaction according to the PP interaction dataset. The binary interaction attribute $I(g, g')$ indicates whether the proteins encoded by g and g' exhibit a PP interaction in our multi-species PP interaction network (Figure 2A). Similarly, the common interactors attribute, $CI(g, g')$, considers the statistical significance of the observed number of common PP interactors of the proteins encoded by g and g' , in the multi-species PP interaction network (Figure 2B). Specifically, $CI(g, g')$ is assigned a P value derived from a one-tailed Fisher's exact test (N = the number of genes encoding proteins that are in the multi-species PP interaction network).

We defined a biological network called the PhEP network, where two genes g and g' are connected by an edge if and only if the Pearson correlation of their gene expression exceeds 0.35, their gene products exhibit a PP interaction, or their orthologues (in any species considered here) exhibit a PP interaction (Figure 2C,D). For a given gene, we measured how surprising it is to witness the observed number of its neighbors (i.e. genes connected to it by one edge) in the PhEP network labeled with a specific phenotype identified by RNAi in *C. elegans*. This was measured using a one-tailed Fisher's exact test (N = the number of genes with some assigned phenotype). If the derived P value is less than or equal to 0.05 for g and g' (Figure 2C), we assign a value of 1 to a categorical variable $M(g, g')$, and 0 otherwise. Similarly, if g and g' exhibit a phenotype that is also enriched in both their neighborhoods in the PhEP network (Figure 2D), we assigned a value of 1 to a categorical variable $NPh(g, g')$, and 0 otherwise.

Missing values for any of the derived attributes (due to missing values in the underlying datasets) were replaced with the expected value (i.e. the sample mean) of the attribute before training.

Model specification, training and cross-validation

The logistic regression model is of the form:

$$\ln\left(\frac{p(g, g')}{1-p(g, g')}\right) = c_0 + c_{Exp} Exp(g, g') + c_{Ph} Ph(g, g') + c_{CI} CI(g, g') + c_N N(g, g') + c_{NPh} NPh(g, g')$$

where $p(g, g')$ is the probability of a genetic interaction between genes g and g' , c_0 is the learned intercept term of the model, c_{Exp} , c_{Ph} , c_{CI} , c_N , c_{NPh} are the learned coefficients for the attributes,

and $Exp(g, g')$, $Plh(g, g')$, $I(g, g')$, $CI(g, g')$, $M(g, g')$ and $NPlh(g, g')$ are the attribute values for g and g' .

To select the optimal logistic regression model in the context of our learning set and attributes, we assessed models defined by different attribute combinations and trained with different positive:negative weight ratios. Specifically, we trained models using each of the following weight ratios: 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 and 1:100. If negative examples are weighted more heavily, prediction errors on these examples result in greater penalties, and model coefficients are fitted accordingly. Using each weight ratio, we trained the models defined by all non-empty subsets of the attributes (in total, $2^6 - 1 = 63$ models), with each of five different folds of the learning set to avoid learning set bias. In training each model with the iterative weighted least squares algorithm [61], we assume that the initial fit estimated from the weighted data is reasonably close to the optimal fit, and thus assume that the algorithm converges to the optimal fit (with the default tolerance and at most 50 iterations). For each fold, we define the optimal model as the model that yielded the lowest Akaike's Information Criterion (AIC), a measure that considers both fit to the data and complexity of the model. Any weight ratio that did not yield the same optimal model for all five folds was eliminated from consideration. For each remaining weight ratio, we computed the mean AIC of the optimal model (across the folds). The 1:2 weight ratio yielded the lowest mean AIC and we thus selected this ratio and the corresponding optimal model to define our genetic interaction predictor. Therefore, within the scope of logistic regression models defined by our attributes and trained with our learning set and tested weight ratios, the full model that uses all six attributes was found to be optimal based on our convergence assumptions and the AIC (Table S7).

Leave-one-out cross-validation of the full model was performed to obtain true and false positive rates for "unseen" data (Figure S1). The final predictor was trained on the full learning set using the tuned weighting and all six attributes. If a pair of genes has a prediction score ≥ 0.85 , the two genes are predicted to genetically interact.

Logistic regression is a technique that does not take into account the obvious dependencies between the attributes. To test the strength of dependencies between attributes we experimented with graphical models, specifically by using a software package for learning Bayesian networks (i.e. the deal package v1.2-30) [62]. The learning set used to train the logistic model was also used to train a Bayesian network. The resulting network exhibits several dependencies between the attributes (Figure S5), many of which are expected since some attributes are derived from the same underlying datasets. Although predictive accuracy might be improved if these attribute dependencies were accounted for, doing so would require a more sophisticated predictive model that relies on an abundance of data to accurately quantify the dependencies. Due to the paucity of attribute data for some genes (e.g. a gene may only have data for the *Exp* and *N* attributes), such a predictive model trained with the current datasets would not necessarily be advantageous over a simpler model (such as a logistic regression model).

Predictions from other genetic interaction predictors

The functional interactions predicted by the Lee *et al.* method were obtained from the WormNet v1 core set [9]. The genetic interactions predicted by the Zhong and Sternberg method were downloaded in June, 2006 [10]. The names of the genes in these prediction datasets were updated to the names used in WormBase release WS180.

Quantifying the information available for a gene

In quantifying the information available for a gene, we took into account the usefulness of particular types of data for the prediction

of genetic interactions. Specifically, if there is sufficient data to compute the value of a predictive attribute (e.g. *Exp*) for any pair involving a particular gene, the usefulness of the value is quantified by the magnitude of the weight of the attribute in the predictive model (e.g. $|c_{Exp}|$). The total quantity of information available for a gene is thus defined as the sum of the magnitudes of weights corresponding to attributes for which values can be computed. The quantities were scaled to be in $[0,1]$ via division by the maximum quantity achievable. The subsequent relative quantities allow for comparisons between predictors that use different attributes (see Figure S3).

Analysis of the predicted genetic interaction network with pathway annotations

The biological validity of the predicted genetic interaction network was assessed *in silico* by computing the shortest path distance between genes annotated to the same pathway. We defined the predicted network such that a node exists for each *C. elegans* gene and an edge exists between two genes if they are predicted to genetically interact. We also defined 100K randomized networks such that each randomized network is identical to the predicted network, except that the nodes are assigned a random permutation of the gene labels. *C. elegans* pathway annotations derived from human were obtained from KEGG release 44 (<http://www.genome.jp/kegg/>) and signaling pathway annotations derived directly from *C. elegans* were obtained from [63] (Table S3). Using the predicted network and each randomized network, the shortest path distance (i.e. the minimum number of edges to traverse in a given network to get from one gene to the other) was computed for every pairing of genes annotated to the same pathway. For each network, we subsequently computed d_i , the number of pathway gene pairs with shortest path distance = i , for $i = 1, 2$. d_1 represents the number of within-pathway interactions based on the given set of pathway annotations (Figure 3A). d_2 represents the number of pathway gene pairs that are not connected directly, but share ≥ 1 neighbor in the network, suggesting within- or between-pathway interactions (Figure 3B). Let $d_{i,pred}$ represent d_i of the predicted network. The significance of $d_{i,pred}$ was estimated with a permutation P value = $(x + 1)/(N + 1)$ [64], where x is the number of randomized networks with $d_i \geq d_{i,pred}$ and N is the total number of randomized networks. We further examined pathway gene pairs with shortest path distance = 2 in the predicted network. Specifically, we computed the percentage of these pairs that satisfy the following criterion: the given pair has ≥ 1 shared neighbor that is not annotated to any of the pathways associated with either member of the pair. The pairs that satisfy this criterion likely exhibit predicted within-pathway interactions with an unknown member of the pathway of the pair, or predicted between-pathway interactions.

Nematode strains

Nematodes were grown on nematode growth media (NGM; Brenner, 1974) at 20°C. Bristol strain N2 animals were used as wild-type animals. Nematode strains containing the following alleles were retrieved from the *Caenorhabditis Genetic Center* (CGC), which is funded by the NIH National Center for Research Resources (NCRR): *rf-1* (*pk1417*), *ppw-1* (*pk2505*), *dxb-1* (*cx36*), *unc-89* (*e1460*), *unc-89* (*st85*), *unc-89* (*ok1116*), *unc-89* (*ok1659*), *unc-96* (*su151*), *tra-4* (*ok1636*), *mel-11* (*sb56*), *trp-2* (*gk298*) (WormBase: WBGene00006615), *smo-1* (*ok359*) (WormBase: WBGene00004888), *aspm-1* (*ok1208*), *lin-36* (*n766*) (WormBase: WBGene00003021), *F42G8.10* (*ok1199*) (WormBase: WBGene00018361), *tag-163* (*ok644*) (WormBase: WBGene00006508), *F54D5.4* (*ok2046*) (WormBase: WBGene00010050), *dys-1* (*cx18*), *hlt-1* (*cc561*) (see Table S8).

RNAi and drug treatment

Blebbistatin (100 μM) and ML-7 (50 μM) were incorporated in NGM agar before plate pouring. The drug-containing plates were used throughout RNAi treatment. The pL4440-dest-*gdi-1* construct, used to submit animals to RNAi against *gdi-1*, was kindly provided by Dr Marc Vidal, Dana-Farber Cancer Institute. The pL4440-dest-*egfp* construct was generated as described previously [65]. These constructs were transformed into HT115 (DE3) strains [66] and the animals were submitted to RNAi treatment as previously described [67]. To score the sterility phenotype (Ste), synchronized L1 larvae were fed RNAi-expressing bacteria for 72h at 18°C. Three young adults were then transferred to fresh plates seeded with RNAi-expressing bacteria and they were allowed to lay eggs for 48h at 18°C. The progeny were counted and sterility was measured as detailed in the Epistasis statistics section. The penetrances of the endomitotic oocyte (Emo) and gonad morphogenesis defect (Gon) phenotypes were scored after DAPI staining the RNAi-treated animals fixed with methanol. Emo and Gon phenotypes were scored by fluorescence microscopy using a Leica DM5500 microscope equipped with a 63× oil-immersion objective and using regular sets of filters for excitation at an ultraviolet wavelength. An animal was considered as expressing the Emo phenotype if at least one endomitotic oocyte was present in the gonad. An animal was considered as expressing the Gon phenotype if its gonad was significantly shorter than gonads observed in N2 animals. The position of the gonad turn with respect to the anterior and posterior intestine nuclei was used to measure the relative length of a gonad. Muscle degeneration was observed in methanol-fixed nematodes upon polarized-light illumination, using a Leica DM5500 microscope equipped with a 100× oil-immersion objective. Only the centermost 20 cells of the two muscle quadrants facing the objective were observed to quantify the abnormal cells. Fluorescent microscopy pictures were captured using the Leica DFC350FX R2 camera and the Leica AF6000 software series. Polarized light microscopy pictures were captured from a Zeiss Axioimager Z1 equipped with a 63× oil-immersion objective and an Axiocam HRM camera controlled by the Axiovision software v4.5. The potential modulation of RNAi efficiency in the different backgrounds tested, and the relative contribution of balancers to identified genetic interactions, were examined to confirm the validity of our results (see Text S1 and Figure S6).

Measurement of sheath cell contraction

Sheath cell contraction rates were scored in anesthetized animals (0.1% tricaine and 0.01% tetramisole in M9 buffer) as previously described [68]. Basal contractions were estimated by monitoring lateral sheath displacement [69] upon DIC illumination at room temperature, using a Leica DM5500 microscope equipped with a 63× oil-immersion objective.

Epistasis statistics

Let $\phi_x \in [0,1]$ represent the level of a particular phenotype expressed by genetic population x . Conversely, let $F_x = 1 - \phi_x$ represent the “fitness” of x with respect to the phenotype, e.g. a maximal value of 1 indicates that the phenotypic defects are absent in all animals of type x . Let ϕ_m , ϕ_{gdi-1} , $\phi_{m/gdi-1}$ and ϕ_{wt} represent the level of the phenotype expressed by animals with mutation(s) in (predicted interactor) gene m , wild-type animals submitted to *gdi-1*(RNAi), m -mutant animals submitted to *gdi-1*(RNAi) and wild-type animals, respectively. Three different models were used to quantify epistatic effects through an epistasis coefficient ϵ . The models use values that have been normalized to wild-type levels, i.e. $\phi'_x = \phi_x - \phi_{wt}$ and $F'_x = F_x / F_{wt}$. Under the

minimum model [70]:

$$\begin{aligned} \epsilon &= (F_{m/gdi-1} - F_{wt}) - \min(F_m - F_{wt}, F_{gdi-1} - F_{wt}) \\ &= \max(\phi'_m, \phi'_{gdi-1}) - \phi'_{m/gdi-1} \end{aligned}$$

Under the additive model [25]:

$$\epsilon = (\phi'_m + \phi'_{gdi-1}) - \phi'_{m/gdi-1}$$

Under the multiplicative model [25]:

$$\epsilon = F'_{m/gdi-1} - F'_m \cdot F'_{gdi-1}$$

Within each model, a function of the phenotypic level expressed by the doubly-altered population (e.g. $\phi_{m/gdi-1}$) is compared to some expectation of the level, given what is known about the populations with the single-gene perturbations. This expectation is computed by a model-specific function, $f(\phi_m, \phi_{gdi-1}, \phi_{wt}) \in [0,1]$. For example, under the additive model, $f(\phi_m, \phi_{gdi-1}, \phi_{wt}) = \phi'_m + \phi'_{gdi-1}$ if $\phi'_m + \phi'_{gdi-1} \leq 1$, otherwise $f(\phi_m, \phi_{gdi-1}, \phi_{wt}) = 1$.

If $\epsilon < 0$, there is a synergistic interaction between m and *gdi-1*. If $\epsilon > 0$, there is an antagonistic interaction. We also identified genes that, when mutated, specifically suppress the phenotypic effects of *gdi-1*(RNAi) (observed in wild-type animals). This was achieved by statistically testing if $\phi'_{gdi-1} - \phi'_{m/gdi-1} > 0$. See Text S1 for details regarding all statistical tests performed, including details about our normality assumption (Figure S7).

The Ste level expressed by a genetic population x was defined as $\phi_x = 1 - B_x / B_{wt}$, where B_x and B_{wt} are the brood size measurements for x and wild-type animals, respectively. The Gon and Emo levels were defined as $\phi_x = n_x / n_{x,total}$, where n_x is the number of x animals observed to have the phenotype and $n_{x,total}$ is the total number of x animals examined.

Statistic for the suppression of muscle degeneration

Let $\phi_x = y_x / n_x$ represent the level of muscle degeneration expressed by an animal in genetic population x , where y_x is the number of abnormal muscle cells and n_x is the total number of muscle cells observed in the animal. In each independent experiment, at least 20 animals were observed for each genetic population. We statistically tested the hypothesis that $\phi_{m/gdi-1} < \phi_m$, i.e. *gdi-1*(RNAi) treatment suppresses the muscle degeneration observed in m -mutant animals. Specifically, the hypothesis was tested using the Mann-Whitney test and a P value was obtained for each independent experiment. The P values were combined to compute an overall P value using the weighted- Z method [71] ($N = 3$). The weight of each independent experiment was the total number of animals observed (i.e. the number of *gdi-1*(RNAi) treated m -mutant animals observed plus the number of control-treated m -mutant animals observed).

Supporting Information

Text S1 Supporting Methods.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010624.s001 (0.05 MB DOC)

Figure S1 Receiver-operating-characteristic curve of the genetic interaction predictor. The error rates were estimated with leave-one-out cross-validation. The threshold associated with each point (i.e. a pair of rates) is indicated in red text. Only the portion of the curve with the smallest false positive rates is shown since, in

practice, having fewer false positives instead of greater sensitivity is more important for laborious experimental validation.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010624.s002 (0.08 MB TIF)

Figure S2 Comparison of genome-wide genetic interactions predicted by different approaches. (A) Venn diagrams of predicted interactions from Zhong and Sternberg [10], Lee *et al.* [9] and this study. Left, interactions between any *C. elegans* genes. Right, interactions between *C. elegans* genes with human orthologues. Our approach predicts many novel interactions and about 85% of them are between *C. elegans* genes without human orthologues. (B) Comparison of the mean number of predicted interactions per gene and the percentage of genes with predicted interactions (i.e. the percentage of the genome covered by the set of predicted interactions), between two studies. The comparisons are made in the context of mental retardation and synaptic plasticity (MRSP) genes only and in the genome-wide context (GW). (C) Comparison of the number of human genes whose *C. elegans* orthologues have predicted interactions, stratified by gene characterization index (see Text S1). Our approach predicts novel interactions for genes orthologous to poorly-characterized human genes.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010624.s003 (0.42 MB TIF)

Figure S3 The relationship between the quantity of information available for a gene and the number of predicted genetic interactions. The quantity of information available for a gene is a measure that takes into account the fact that some gene pair attributes are more informative than others for predicting genetic interactions. See the Methods for the computation of the total quantity of information for each gene. MRSP: mental retardation and synaptic plasticity; ZS: Zhong and Sternberg [10]. (A) The total quantity of information available for MRSP genes with the ZS approach and with our approach. The three sets of boxplots correspond to MRSP genes with predicted interactions in this study only, in the ZS study only and in neither study, respectively. (B) Types and total quantity of information available for MRSP genes with the ZS approach and with our approach. Each column corresponds to a gene and a black entry indicates that there is information for the gene of the type specified (to the left) by the row (except for the row labeled "Total quantity of information"). The ZS approach separates the information from three organisms: *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*), *Drosophila melanogaster* (*Dm*) and *Caenorhabditis elegans* (*Ce*). The information types (i.e. attributes) of this study are described in the Results and Methods. For each approach, there is also a row indicating the total quantity of information (scaled between 0 and 1), where white and black indicate zero and maximal information, respectively. The heatmap in the middle illustrates the number of interactions predicted for each gene by the different approaches, where a greater intensity of red corresponds to a greater number. *gdi-1* is highlighted in green.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010624.s004 (1.22 MB TIF)

Figure S4 Different methods for estimating the *P* value associated with a Pearson correlation value measuring the coexpression of two genes in the Kim *et al.* dataset [14]. The grey bars indicate the empirical *P* values associated with bins of correlation values. The *t*-distribution (blue line) and Fisher's χ^2 transform (red line) methods do not produce *P* values that match the empirical trend closely. In contrast, the fitted normal distribution approximates the empirical distribution well (green line).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010624.s005 (0.14 MB TIF)

Figure S5 The dependencies between the predictive gene pair attributes as defined by a learned Bayesian network. See the Methods for how the Bayesian network was derived.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010624.s006 (0.13 MB TIF)

Figure S6 The interaction of *gdi-1* with unbalanced heterozygotes of *aspm-1(ok1208)*. The mean penetrance/expressivity of the Emo phenotype in wild-type (*wt*) or unbalanced *aspm-1(ok1208)* heterozygotes (*aspm-1(ok1208) +/-*), submitted to either *egfp* or *gdi-1* RNAi, is shown. The error bars correspond to \pm one standard error over three independent experiments. (*) indicates a statistical difference between *wt* and *aspm-1(ok1208) +/-* animals submitted to *gdi-1*(RNAi) ($P \leq 0.05$, see Methods).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010624.s007 (0.08 MB TIF)

Figure S7 Validity of the normality assumption for the application of Student's *t*-tests to phenotype measurement data. The bars represent the empirical distribution of scaled phenotype values induced by *gdi-1*(RNAi) treatment (see Text S1). Each red line is a fitted normal distribution.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010624.s008 (0.11 MB TIF)

Table S1 Genetic interactions hand-curated from the literature. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010624.s009 (0.05 MB XLS)

Table S2 Performance of genetic interaction predictors. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010624.s010 (0.02 MB XLS)

Table S3 Signaling pathway genes curated from the *C. elegans* literature. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010624.s011 (0.05 MB XLS)

Table S4 Curated set of mental retardation and synaptic plasticity genes and their *C. elegans* orthologues (204 genes). Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010624.s012 (0.04 MB XLS)

Table S5 Epistasis coefficients of experimentally tested genetic interactions. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010624.s013 (0.03 MB XLS)

Table S6 Epistasis *P* values of experimentally tested genetic interactions. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010624.s014 (0.02 MB XLS)

Table S7 AIC values of 63 logistic regression models that use different combinations of the gene pair attributes. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010624.s015 (0.03 MB XLS)

Table S8 Genotypes of *C. elegans* strains used in this study. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010624.s016 (0.02 MB XLS)

Acknowledgments

We thank Marc Vidal (Dana-Farber Institute) for the pL4440-*gdi-1* construct; Nathalie Dourdin, Alexandre Arnold and Borhane Annabi for critical reading of the manuscript; and Sara J. Calafell Goslino for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MH SJ. Performed the experiments: AYWL RP SH SJ. Analyzed the data: AYWL SJ.

References

- Schubert V, Doti CG (2007) Transmitting on actin: synaptic control of dendritic architecture. *J Cell Sci* 120: 205–212.
- Newey SE, Velamoor V, Govck EE, Van Aelst L (2005) Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *J Neurobiol* 64: 58–74.
- Kutsche K, Yntema H, Brandt A, Jantke I, Nothwang HG, et al. (2000) Mutations in ARI1GEP6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat Genet* 26: 247–250.
- Tavaozi SF, Alvarez VA, Ridenour DA, Kwiatkowski DJ, Sabatini BL (2005) Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nat Neurosci* 8: 1727–1734.
- D'Adamo P, Menegon A, Lo Nigro C, Grasso M, Gulisano M, et al. (1998) Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat Genet* 19: 134–139.
- Kim H, Rogers MJ, Richmond JE, McIntire SL (2004) SNF-6 is an acetylcholine transporter interacting with the dystrophin complex in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 430: 891–896.
- de Voer G, Peters D, Taschner PE (2008) *Caenorhabditis elegans* as a model for lysosomal storage disorders. *Biochim Biophys Acta* 1782: 433–446.
- Artal-Sanz M, de Jong L, Tavernarakis N (2006) *Caenorhabditis elegans*: a versatile platform for drug discovery. *Biotechnol J* 1: 1405–1418.
- Lee I, Lehner B, Crombie C, Wong W, Fraser AG, et al. (2008) A single gene network accurately predicts phenotypic effects of gene perturbation in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* 40: 181–188.
- Zhong W, Sternberg PW (2006) Genome-wide prediction of *C. elegans* genetic interactions. *Science* 311: 1481–1484.
- Chipman KC, Singh AK (2009) Predicting genetic interactions with random walks on biological networks. *BMC Bioinformatics* 10: 17.
- D'Adamo P, Woller DP, Kopp C, Tobler I, Toniolo D, et al. (2004) Mice deficient for the synaptic vesicle protein Rab3a show impaired spatial reversal learning and increased explorative activity but none of the behavioral changes shown by mice deficient for the Rab3a regulator Gdi1. *Eur J Neurosci* 19: 1895–1905.
- Tong AH, Lesage G, Bader GD, Ding H, Xu H, et al. (2004) Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* 303: 808–813.
- Kim SK, Lund J, Kiraly M, Duke K, Jiang M, et al. (2001) A gene expression map for *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293: 2087–2092.
- Formstecher E, Aresta S, Collura V, Ilamburger A, Meil A, et al. (2005) Protein interaction mapping: a *Drosophila* case study. *Genome Res* 15: 376–384.
- Sielz U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brenbeck FH, et al. (2005) A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* 122: 957–968.
- O'Brien KP, Remm M, Sonnhammer EL (2005) Inparanoid: a comprehensive database of eukaryotic orthologs. *Nucleic Acids Res* 33: D476–480.
- Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, et al. (1999) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 27: 29–34.
- Lehner B, Crombie C, Tischler J, Fortunato A, Fraser AG (2006) Systematic mapping of genetic interactions in *Caenorhabditis elegans* identifies common modifiers of diverse signaling pathways. *Nat Genet* 38: 896–903.
- Byrne AB, Weirauch MT, Wong V, Koeva M, Dixon SJ, et al. (2007) A global analysis of genetic interactions in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol* 6: 8.
- Costanzo M, Baryshnikova A, Bellay J, Kim Y, Spear ED, et al. (2010) The genetic landscape of a cell. *Science* 327: 425–431.
- Kemmer D, Podowski RM, Yusuf D, Brumm J, Cheung W, et al. (2008) Gene characterization index: assessing the depth of gene annotation. *PLoS ONE* 3: e1440.
- Silverman GA, Luke CJ, Bhatia SR, Long OS, Verica AC, et al. (2009) Modeling molecular and cellular aspects of human disease using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Pediatr Res* 65: 10–18.
- Mani R, Si Ong RP, Hartman JLA, Giaever G, Roth FP (2008) Defining genetic interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3461–3466.
- Cordell HJ (2002) Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. *Hum Mol Genet* 11: 2463–2468.
- Mercer KB, Miller RK, Tintley TL, Sheth S, Qadota H, et al. (2006) *Caenorhabditis elegans* UNC-96 is a new component of M-lines that interacts with UNC-98 and paramyosin and is required in adult muscle for assembly and/or maintenance of thick filaments. *Mol Biol Cell* 17: 3832–3847.
- Benian GM, Tintley TL, Tang X, Borodovsky M (1996) The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-89*, required for muscle M-line assembly, encodes a giant modular protein composed of Ig and signal transduction domains. *J Cell Biol* 132: 835–848.
- Grote P, Conradt B (2006) The PLZF-like protein TRA-4 cooperates with the Gli-like transcription factor TRA-1 to promote female development in *C. elegans*. *Dev Cell* 11: 561–573.
- van der Voet M, Berends CW, Perreault A, Nguyen-Ngoc T, Gonczy P, et al. (2009) NuMA-related LIN-5, ASPM-1, calmodulin and dynein promote meiotic

Contributed reagents/materials/analysis tools: ELB MS SJ. Wrote the paper: AYWL RP MH SJ.

- spindle rotation independently of cortical LIN-5/GPR/Galpha. *Nat Cell Biol* 11: 269–277.
- Bond J, Woods CG (2006) Cytoskeletal genes regulating brain size. *Curr Opin Cell Biol* 18: 95–101.
- Gieseler K, Bessou C, Segalat I. (1999) Dystrobrevin- and dystrophin-like mutants display similar phenotypes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurogenetics* 2: 87–90.
- Albrecht DE, Froehner SC (2002) Syntrophins and dystrobrevins: defining the dystrophin scaffold at synapses. *Neurosignals* 11: 123–129.
- Grisoni K, Martin E, Gieseler K, Mariol MC, Segalat I. (2002) Genetic evidence for a dystrophin-glycoprotein complex (DGC) in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 294: 77–86.
- Blake DJ, Nawrotzki R, Loh NY, Gorecki DC, Davies KE (1998) beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 241–246.
- Gieseler K, Grisoni K, Mariol MC, Segalat I. (2002) Overexpression of dystrobrevin delays locomotion defects and muscle degeneration in a dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Neuromuscul Disord* 12: 371–377.
- Kelley R, Ideker T (2005) Systematic interpretation of genetic interactions using protein networks. *Nat Biotechnol* 23: 561–566.
- Huang CC, You JL, Wu MY, Hsu KS (2004) Rap1-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation facilitates AMPA receptor trafficking via the GDI/Rab5 complex. Potential role in (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine-induced long term depression. *J Biol Chem* 279: 12286–12292.
- Bianchi V, Farisello P, Baldelli P, Meskenaitė V, Milanese M, et al. (2009) Cognitive impairment in Gdi1-deficient mice is associated with altered synaptic vesicle pools and short-term synaptic plasticity, and can be corrected by appropriate learning training. *Hum Mol Genet* 18: 105–117.
- Clandinin TR, DeModena JA, Sternberg PW (1998) Inositol triphosphate mediates a RAS-independent response to L1E1-23 receptor tyrosine kinase activation in *C. elegans*. *Cell* 92: 523–533.
- Barbara JG (2002) IP3-dependent calcium-induced calcium release mediates bidirectional calcium waves in neurons: functional implications for synaptic plasticity. *Biochim Biophys Acta* 1600: 12–18.
- Miller MA, Ruest PJ, Kosinski M, Hanks SK, Greenstein D (2003) An Eph receptor sperm-sensing control mechanism for oocyte meiotic maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 17: 187–200.
- Xu X, Lee D, Shih HY, Seo S, Ahn J, et al. (2005) Linking integrin to IP(3) signaling is important for ovulation in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett* 579: 549–553.
- Shi Y, Eitell IM (2006) Integrins control dendritic spine plasticity in hippocampal neurons through NMDA receptor and Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated actin reorganization. *J Neurosci* 26: 1813–1822.
- Aoto J, Chen J. (2007) Bidirectional ephrin/Eph signaling in synaptic functions. *Brain Res* 1184: 72–80.
- Tokuoka SM, Saiardi A, Nurrish SJ (2008) The mood stabilizer valproate inhibits both inositol- and diacylglycerol-signaling pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 19: 2241–2250.
- Gilbert SF, Bolker JA (2001) Homologies of process and modular elements of embryonic construction. *J Exp Zool* 291: 1–12.
- Fish JL, Dehay C, Kennedy H, Hutner WB (2008) Making bigger brains—the evolution of neural progenitor-cell division. *J Cell Sci* 121: 2783–2793.
- Miskowski J, Li Y, Kimble J (2001) The *sys-1* gene and sexual dimorphism during gonadogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 230: 61–73.
- Bender AM, Kirienko NV, Olson SK, Esko JD, Fay DS (2007) *lin-35/Rb* and the *CoREST* ortholog *spr-1* coordinately regulate vulval morphogenesis and gonad development in *C. elegans*. *Dev Biol* 302: 448–462.
- Bender AM, Wells O, Fay DS (2004) *lin-35/Rb* and *xnp-1/ATR-X* function redundantly to control somatic gonad development in *C. elegans*. *Dev Biol* 273: 335–349.
- Ryu J, Liu L, Wong TP, Wu DC, Burette A, et al. (2006) A critical role for myosin IIb in dendritic spine morphology and synaptic function. *Neuron* 49: 175–182.
- Zhang H, Webb DJ, Asmussen H, Niu S, Horwitz AF (2005) A G11/P1X/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J Neurosci* 25: 3379–3388.
- Lamprecht R, Margulies DS, Farb CR, Hou M, Johnson LR, et al. (2006) Myosin light chain kinase regulates synaptic plasticity and fear learning in the lateral amygdala. *Neuroscience* 139: 821–829.
- D'Adamo P, Welzl H, Papadimitriou S, Raffaele di Barletta M, Tiveron C, et al. (2002) Deletion of the mental retardation gene *Gdi1* impairs associative memory and alters social behavior in mice. *Hum Mol Genet* 11: 2567–2580.
- Johnson RP, Kang SH, Kramer JM (2006) *C. elegans* dystroglycan DGX-1 functions in epithelia and neurons, but not muscle, and independently of dystrophin. *Development* 133: 1911–1921.

56. Akaaboune M, Grady RM, Turney S, Sanes JR, Lichtman JW (2002) Neurotransmitter receptor dynamics studied in vivo by reversible photo-unbinding of fluorescent ligands. *Neuron* 34: 865–876.
57. Blake DJ (2002) Dystrobrevin dynamics in muscle-cell signalling: a possible target for therapeutic intervention in Duchenne muscular dystrophy? *Neuromuscul Disord* 12 Suppl 1: S110–117.
58. Gieseler K, Grisoni K, Segalat L (2000) Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 10: 1092–1097.
59. R Development Core Team (2007) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
60. Muller HM, Kenny EE, Sternberg PW (2004) Textpresso: an ontology-based information retrieval and extraction system for biological literature. *PLoS Biol* 2: e309.
61. Nelder JA, Wedderburn RWM (1972) Generalized Linear Models. *Journal of the Royal Statistical Society Series A-General* 135: 370–384.
62. Böttcher SG, Dethlefsen C (2003) Deal: a package for learning Bayesian Networks. *J Stat Software* 8: 1–40.
63. Riddle DL, Blumethal T, Meyer BJ, Priess JR, eds (1997) *C. elegans II*. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1222 p.
64. Moore D, McCabe G, Craig B (2009) Bootstrap Methods and Permutation Tests. In: Burke S, Scanlan-Rohrer A, Byrd M, eds. *Introduction to the Practise of Statistics*, 6th edition. New York: W.H. Freeman and Company. pp 16:11–60.
65. Caruso ME, Jenna S, Bouchevarcilh M, Baillie DL, Boismenu D, et al. (2008) GTPase-mediated regulation of the unfolded protein response in *Caenorhabditis elegans* is dependent on the AAA+ ATPase CDC-48. *Mol Cell Biol* 28: 4261–4274.
66. Timmons L, Court DL, Fire A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263: 103–112.
67. Jenna S, Caruso ME, Emadali A, Nguyen DT, Dominguez M, et al. (2005) Regulation of membrane trafficking by a novel Cdc42-related protein in *Caenorhabditis elegans* epithelial cells. *Mol Biol Cell* 16: 1629–1639.
68. McCarter J, Bartlett B, Dang T, Schedl T (1999) On the control of oocyte meiotic maturation and ovulation in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 205: 111–128.
69. Miller MA, Nguyen VQ, Lee MH, Kosinski M, Schedl T, et al. (2001) A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation. *Science* 291: 2144–2147.
70. Tong AH, Evangelista M, Parsons AB, Xu H, Bader GD, et al. (2001) Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* 294: 2364–2368.
71. Whitlock MC (2005) Combining probability from independent tests: the weighted Z-method is superior to Fisher's approach. *J Evol Biol* 18: 1368–1373.
72. Wissmann A, Hughes J, Mains PE (1999) The *Caenorhabditis elegans* mcl-1 myosin phosphatase regulatory subunit affects tissue contraction in the somatic gonad and the embryonic epidermis and genetically interacts with the Rac signaling pathway. *Dev Biol* 209: 111–127.

CHAPITRE IV

Discussion
et
Conclusion

Discussion

gdi-1* joue des rôles importants dans la fertilité de *C. elegans

Il s'agit de la première étude portant uniquement sur *gdi-1*, l'homologue jusqu'alors non caractérisé de *GDI1* chez *C. elegans*. Contrairement à l'humain et à la souris, *C. elegans* ne contient pas deux mais qu'un gène codant pour une RabGDI. Il s'agit d'un gène essentiel puisque le mutant contenant une délétion dans l'allèle *tm660* est stérile et non viable (Mitani 2000). L'ARNi permet d'étudier la fonction de ce type de gène, car étant donné qu'il s'agit que d'une diminution d'expression du gène, il demeure une quantité suffisante de protéine pour assurer la survie. Par contre, cette méthode ne permet pas de diminuer l'expression de manière substantielle dans les cellules neuronales de la souche sauvage. Cependant, il est possible de faire un traitement ARNi dans la souche KP3948 (*eri-1;lin-15b*), Cette souche a monté une hypersensibilité à l'ARNi, notamment dans les neurones (Sieburth, Ch'ng et al. 2005). La diminution de l'expression de *gdi-1* n'a pas d'effet apparent majeur dans les organes autres que le système reproducteur dans la souche N2. Les voies de signalisation impliquant *gdi-1* dans le système reproducteur peuvent néanmoins être conservées, du moins partiellement, dans le système nerveux chez les mammifères. En effet, il a été documenté qu'une voie de signalisation pouvait très bien être conservée dans un processus biologique différent et dans un autre organisme (Gilbert and Bolker 2001).

Rôle de *gdi-1* au niveau germinale et somatique

Dans les résultats présentés au chapitre II nous montrons que *gdi-1* pourrait avoir un rôle à jouer au niveau de l'endocytose de lipoprotéines yolk et au niveau du réarrangement du cytosquelette. Ces deux résultats ont été observés par rapport à l'oocyte et donc au niveau germinale. Dans cette partie des résultats, nous montrons aussi que les animaux *gdi-1* (ARNi) présentaient un défaut de morphologie de la

gonade (Gon) indépendant d'une altération de la prolifération des cellules germinales. D'ailleurs, à la figure 3 de l'article au chapitre III nous montrons grâce aux souches *ppw-1(pk2505)* et *rrf-1(pk1417)* que *gdi-1* joue un rôle plus important pour la fertilité au niveau somatique que germinale. En effet, nous y montrons qu'il y a une diminution de la contraction des cellules myoépithéliales de la gonade ainsi qu'une déficience au niveau de la gonadogenèse (Gon). Ces deux processus sont contrôlés essentiellement au niveau somatique. Pour ce qui est du phénotype Emo, comme nous l'avons vu précédemment, il est causé par un problème d'ovulation et/ou de maturation de l'oocyte, donc soit au niveau somatique ou germinale.

Y a-t-il un lien entre les phénotypes observés chez C. elegans gdi-1 (ARNi)

À quel point les phénotypes observés au niveau du système reproducteur sont liés? Chacun des phénotypes peut engendrer la stérilité. Étant donné que les Rabs peuvent toutes être potentiellement régulées par *gdi-1*, il est possible que les différents phénotypes soient causés par des processus biologiques distincts perturbés par le manque de *gdi-1*. À l'inverse, peut-être qu'un seul processus biologique affecté par la diminution d'expression de *gdi-1* engendre à lui seul, sous forme de cascade, tous les phénotypes affectant le système reproducteur. Voici différentes hypothèses de liens entre les différents phénotypes causés par *gdi-1* (ARNi). Par exemple, il est possible que le défaut de contraction provoque le phénotype Emo en perturbant l'ovulation. Ou encore, est-ce que le phénotype Emo pourrait être causé par une mauvaise maturation de l'oocyte (e.g., réarrangement du cytosquelette, endocytose du yolk) et que ce problème soit le point de départ d'une mauvaise ovulation. Enfin, selon notre hypothèse que *gdi-1* jouerait un rôle primordial dans la morphologie cellulaire lors de la gonadogenèse, il serait logique que ce soit le phénotype Gon qui soit le précurseur des autres phénotypes. En effet, l'anomalie morphologique de la gonade ainsi que les défauts de contraction et d'ovulation, pourraient être due à une malformation des cellules somatiques des gonades jouant un rôle dans ces deux mécanismes. Il est en effet tout à fait probable qu'une mauvaise régulation de la

contraction du système actine-myosine au niveau des cellules somatiques des gonades puisse exercer de la résistance mécanique à l'allongement des gonades lors de la morphogenèse de cette dernière ainsi qu'une contraction inefficace de celle-ci lors de l'ovulation.

Au contraire, peut-être que les phénotypes ne sont pas tous reliés. Ainsi, *gdi-1* (ARNi) perturberait le système actine-myosine dans les DTCs pendant la migration de la gonade lors du développement et aussi dans la contraction de la gonade pendant l'ovulation. *gdi-1* (ARNi) perturberait aussi l'endocytose du yolk et/ou le cytosquelette lors de la maturation des oocytes provoquant le phénotype Emo. Toutes ces perturbations affecteraient de façon indépendante la fertilité.

La myosine, son rôle dans la contraction et dans la morphologie des neurones

L'inhibition de la myosine et de MLCK suppriment certains phénotypes de *gdi-1* (ARNi)

Dans cette étude, nous montrons que *gdi-1* (ARNi) a notamment un phénotype de diminution de la contraction des cellules myoépithéliales de la gaine de la gonade. De plus, les inhibiteurs ML-7 et blebbistatine (qui ciblent respectivement MLCK et l'ATPase des myosines II) ainsi que des mutations dans le gène *unc-89*, codant pour une protéine ayant un domaine MLCK, suppriment certains phénotypes de *gdi-1* (ARNi).

L'ovulation chez *C. elegans*

Chez *C. elegans*, les cellules de la gaine de la gonade responsable de la contraction lors de l'ovulation sont des cellules musculaires non striées nommées cellules myoépithéliales (Hall, Winfrey et al. 1999). La contraction est régulée de différentes façons afin d'être couplée avec la maturation de l'oocyte (Ono, Yu et al. 2007), et elle est déclenchée par l'augmentation du taux intracellulaire de calcium (Yin,

Gower et al. 2004; Xu, Lee et al. 2005). La troponine et la tropomyosine sont requis pour l'ovulation (Ono and Ono 2004), ce qui n'est pas normale pour des cellules non striées puisque la troponine est généralement exprimée dans les cellules striées (Ono, Yu et al. 2007). Les muscles lisses (non striés) des vertébrés utilisent plutôt un système faisant intervenir la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK) pour activer la contraction suite à l'augmentation du Ca^{2+} (Takashima 2009) (Figure 4.1). Cependant, plusieurs régulateurs de la myosine et MLCK sont aussi requis pour l'ovulation chez *C. elegans* (Norman, Fazio et al. 2005). Donc l'interaction actine-myosine serait probablement régulée via les deux systèmes, troponine et MLCK, chez les cellules myoépithéliales de la gonade de *C. elegans*.

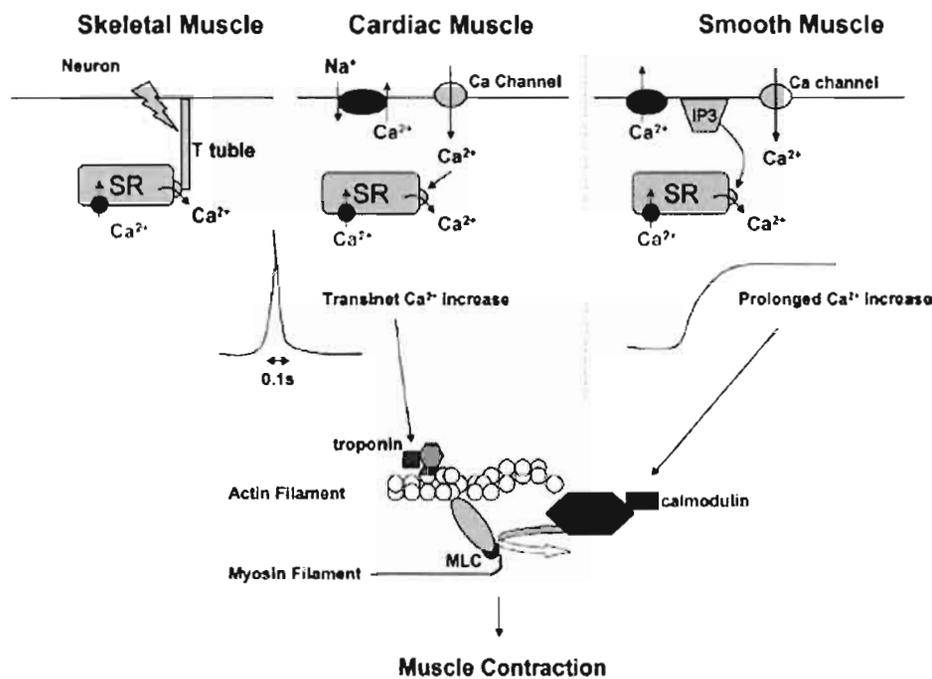


Figure 4.1 Contraction musculaire selon qu'il s'agisse du muscle squelettique (cellules striées), cardiaque (cellules striées) ou lisse (cellules non striées). Dans les trois cas, il s'agit d'une stimulation faisant intervenir le calcium. Dans les deux premiers cas, la contraction est contrôlée par la troponine alors que dans le troisième, par MLCK. L'augmentation du taux de calcium est prolongée dans les muscles lisses comparée aux muscles squelettiques et cardiaques. Tiré de (Takashima 2009).

La myosine et son inhibiteur blebbistatine dans la morphologie des neurones

Les neurones projettent des terminaisons axonales et dendritiques afin de communiquer avec d'autres cellules. Les épines dendritiques reçoivent des signaux de la part des synapses provenant des axones (Figure 4.2). Les neurones montrent des changements de morphologie importants au cours du développement (Sekino, Kojima et al. 2007) (Figure 4.3).

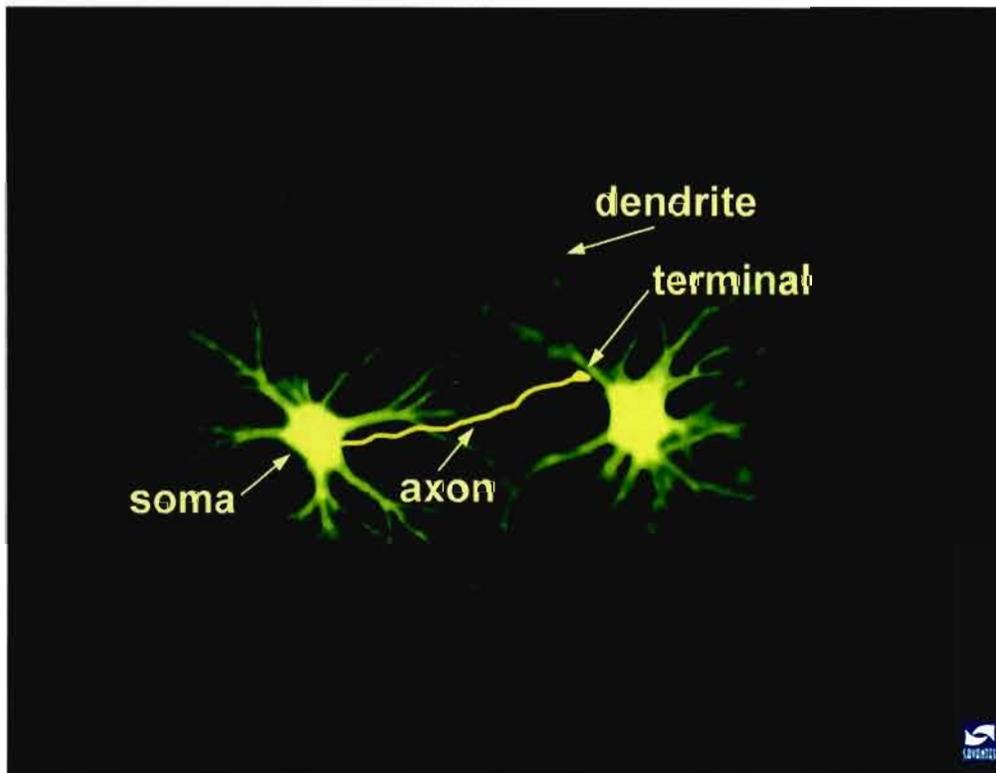


Figure 4.2 Photographie représentant les principales parties neuronales et la communication entre deux neurones. Tiré de (Zubov).

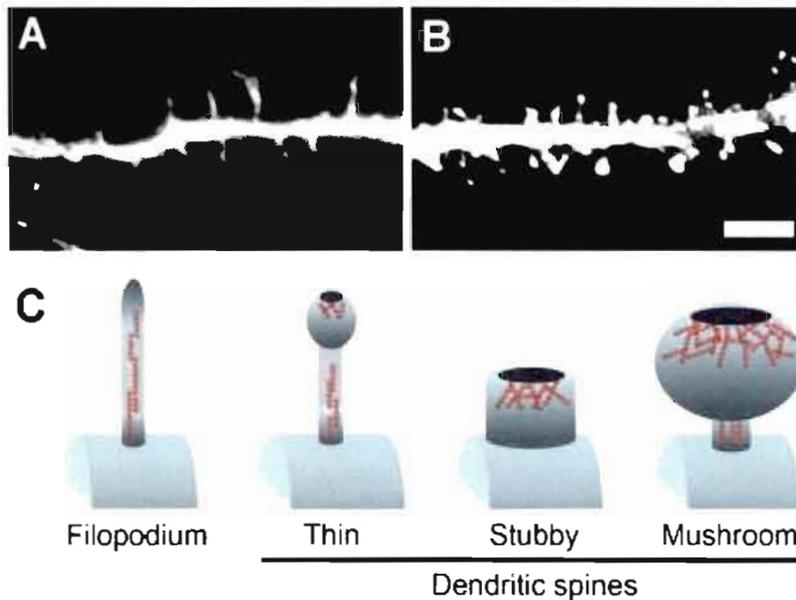


Figure 4.3 Morphologie des épines dendritiques. (A) Épines immatures appelées filopodes (7 jours) et (B) épines dendritiques matures (21 jours) avec des têtes en formes de champignons. (C) Représentation schématique d'un filopode, et des 3 types d'épines dendritiques : mince, trapu et en forme de champignon. Les disques en gris représentent les densités post-synaptiques (PSD) et les cercles rouges les filaments d'actines. Tiré de (Sekino, Kojima et al. 2007).

Les changements de morphologie des épines dendritiques est très importante pour l'apprentissage et la mémorisation (Sekino, Kojima et al. 2007). La potentialisation à long terme est associée à la plasticité dendritique (Matsuzaki, Ellis-Davies et al. 2001). En plus de cette plasticité morphologique, les dendrites et les axones ont aussi la capacité de se déplacer rapidement (Dunaevsky, Tashiro et al. 1999) (Bonhoeffer and Yuste 2002). La myosine joue un rôle dans la régulation de la dynamique des épines dendritiques de façon indépendante à la polymérisation/dépolymérisation d'actine (Okamoto, Nagai et al. 2004). La myosine régule la dynamique de l'actine. Elle se lie à l'actine et hydrolyse l'ATP pour activer le déplacement et maintenir la tension dans les filaments d'actine (Sellers 2000). La myosine II sarcomérique est présente dans les muscles squelettiques et les myosines

IIA et IIB dans les cellules non musculaires. La myosine IIB est prédominante dans les cellules neuronales (Kawamoto and Adelstein 1991). La molécule blebbistatine inhibe spécifiquement l'activité ATPase des myosines II. L'ARNi contre la myosine IIB et la blebbistatine engendrent la perte de la forme en champignon des épines dendritiques dans les cellules de l'hippocampe des rats (Ryu, Liu et al. 2006). De plus, la myosine II joue un rôle dans le déplacement d'actine de la partie distale vers la partie proximale, dans les dendrites en croissance (Medeiros, Burnette et al. 2006).

MLCK et son inhibiteur ML-7 dans la plasticité synaptique

La MLCK est une kinase calcium/calmoduline dépendante qui phosphoryle la chaîne légère régulatrice de la myosine engendrant donc la contraction des filaments d'actomyosine. MLCK est impliquée dans : la libération de neurotransmetteurs; l'activité du récepteur N-méthyle-D-aspartate; la morphogénèse neuronale telle que la régulation de la motilité des cônes en croissance (Sekino, Kojima et al. 2007). Des processus similaires sont impliqués dans les étapes de formation de la mémoire. ML-7 est un inhibiteur spécifique de MLCK. L'injection de ML-7 dans l'amygdale de rat augmente la LTP, la mémoire à court terme ainsi que la mémoire à long terme (Lamprecht, Margulies et al. 2006).

ML-7 comme agent thérapeutique potentiel contre le RM

Nous avons montré l'antagonisme entre *gdi-1* et les régulateurs de la contraction de la machinerie actine-myosine. De plus, nous avons montré que ces phénotypes étaient également supprimés par les agents ML-7 et blebbistatine qui inhibent respectivement les MLCK et l'activité ATPase de la myosine II. Rappelons qu'il a été montré que la myosine II joue un rôle dans la morphologie des dendrites (Ryu, Liu et al. 2006) et que MLCK joue un rôle dans la plasticité synaptique et la mémorisation (Lamprecht, Margulies et al. 2006). ML-7 et la mutation de *Gdi-1* ont des effets opposés dans le cerveau de la souris, soit une augmentation ou une

diminution du conditionnement par la peur et de la plasticité synaptique (Lamprecht, Margulies et al. 2006). Il serait donc intéressant de tester si ML-7 diminue les symptômes neurologiques des souris *Gdi-1* et des patients *GDII*.

Il y a interaction génétique entre *unc-89* et *gdi-1* dans le système reproducteur de *C. elegans*, possiblement lors de la contraction des cellules de l'enveloppe de la gonade lors de l'ovulation. Cette interaction pourrait aussi avoir lieu lors de la migration des DTCs. D'ailleurs, nous avons observé qu'il y avait un phénotype Gon chez le mutant pour *mel-11*, une phosphatase des MLC (Wissmann, Ingles et al. 1999), donc un antagoniste potentiel de *unc-89*.

Antagonisme entre *gdi-1* et *dyb-1*, identification de cibles thérapeutiques contre le RM et la dystrophie musculaire

Le complexe DGC

Dans cette étude, nous montrons qu'un des suppresseurs génétiques identifiés de *gdi-1* est le gène *dyb-1* qui code pour la protéine dystrobrevine. Cette protéine fait partie du « dystrophin glycoprotein complex » (DGC) ou « dystrophin-associated complex » (DAC). Des mutations dans les gènes codant pour des protéines faisant partie de ce complexe causent une dystrophie musculaire, comme la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) dans le cas du gène dystrophine. Le complexe DGC est situé à la membrane plasmique, il fait un lien entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire (Rees, Lien et al. 2007) (Figure 4.4). Ceci a pour effet de stabiliser les fibres musculaires lors des contraintes mécaniques causées par les contractions musculaires (Blake, Weir et al. 2002). Le cerveau est aussi affecté par les différentes mutations qui causent la dystrophie musculaire puisque les patients souffrent aussi de problèmes cognitifs légers (Blake and Kroger 2000). La dystrophie musculaire a fait l'objet de multiples recherches depuis plusieurs années. La pathologie est de plus en plus connue, mais il n'en demeure pas moins que c'est une des maladies les plus difficiles à traiter (Rees, Lien et al. 2007). Donc une

investigation de l'interaction génétique entre *dyb-1* et *gdi-1* permettrait de mieux connaître non seulement le RM mais aussi la DMD, et ainsi d'identifier des agents thérapeutiques contre les 2 maladies.

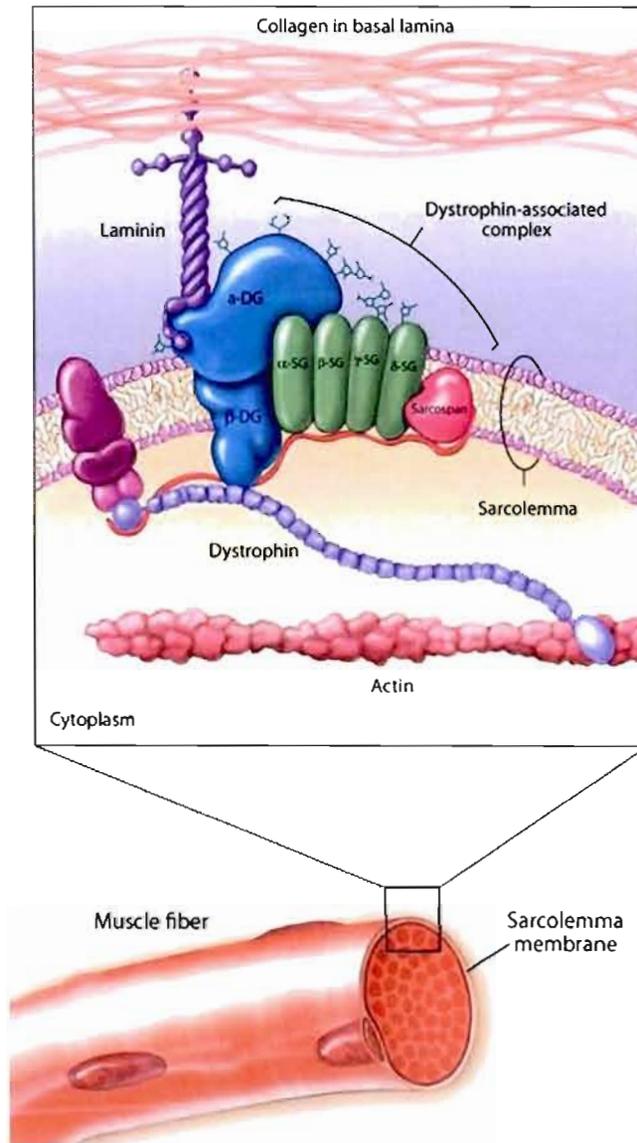


Figure 4.4 Le complexe DGC ou DAC est situé à la membrane plasmique. Il fait un lien en le cytosquelette et la matrice extracellulaire. Ce lien a pour effet de stabiliser les fibres musculaires lors des contraintes mécaniques causées par les contractions musculaires. Image par Lydia Kibiuk.

Dystrobrevine et le DGC dans la dystrophie musculaire

Nous avons montré que non seulement la mutation dans le gène *dyb-1* réduit les phénotypes causés par l'ARNi contre *gdi-1*, mais que cette dernière diminution d'expression diminue le phénotype de dystrophie musculaire présente chez les mutants *dyb-1/hlh-1* et *dys-1/hlh-1*. Les membres du DGC chez *C. elegans*, *dys-1* et *dyb-1*, semblent réguler la stimulation cholinergique en contrôlant l'activité du transporteur acétylcholine SNF-6 au niveau des membranes post-synaptiques (Bessou, Giugia et al. 1998; Gieseler, Mariol et al. 2001; Kim, Rogers et al. 2004). Ces protéines permettraient donc une élimination efficace de l'acétylcholine dans la fente synaptique pour éviter l'hyperexcitabilité musculaire et la dégénérescence musculaire (Kim, Rogers et al. 2004). L'altération de cette fonction serait donc la cause de la dégénérescence musculaire observée chez les mutants dystrophiques.

Les changements qui surviennent dans les muscles des patients DMD sont complexes et il est difficile d'établir les relations entre eux. Il est d'ailleurs possible que la pathologie implique plus d'un mécanisme (e.g., signalisation NO, homéostasie du calcium, augmentation de la perméabilité membranaire et stabilisation des regroupements de récepteurs à la membrane plasmique) (Blake, Weir et al. 2002). D'ailleurs, le rôle exact du DGC dans la dystrophie musculaire est encore incertain (Kim, Rogers et al. 2004). Le rôle du DGC dans la signalisation acétylcholine n'est pas toujours mentionné comme jouant un rôle dans la pathologie de la DMD (Blake and Kroger 2000; Anderson, Head et al. 2002; Blake, Weir et al. 2002; Sekiguchi, Zushida et al. 2009). Pourtant les récepteurs acétylcholines se regroupent avec DGC via Rapsyn (Jacobson, Cote et al. 2001), et dystrobrevine inhibe le recyclage du récepteur (Akaaboune, Grady et al. 2002). Peut-être que le rôle du DGC dans la signalisation acétylcholine est sous-estimé dans la dystrophie musculaire et que l'interaction *gdi-1* et *dyb-1* permettra de mieux comprendre la pathologie. De plus, *gdi-1* devient une cible thérapeutique intéressante contre la dystrophie musculaire.

Dystrobrevine et le DGC dans le cerveau

Les anomalies dans le cerveau causées par la DMD, contrairement à la dégénérescence musculaire, ne seraient pas des désordres progressifs mais plutôt des anomalies développementales (Moizard, Billard et al. 1998). Duchenne lui-même a commenté sur les déficits cognitifs des jeunes garçons atteints de la maladie (e.g., *idiotisme, peu d'intelligence, intelligence ordinaire*) (Duchenne 1868). Cyrulnik et Hinton (2008) ont proposé que les troubles cognitifs de la DMD soient reliés au cervelet, étant donné que les déficits cognitifs engendrés par la disruption dans les voies cérébro-cervelet ressemblent aux déficits observés chez les patients DMD (e.g. problèmes de langage et de lecture). Le cervelet servirait à coordonner la cognition de la même façon qu'il opère pour coordonner les habiletés motrices et l'apprentissage, soit en aidant à automatiser et optimiser les performances dans certains domaines cognitifs (Cyrulnik and Hinton 2008). Maintenant, l'interaction potentielle entre dystrobrevine et GDI-1 dans le cerveau est à déterminer.

Dystrobrevine dans la signalisation cellulaire

Le DGC est donc aussi exprimé dans les tissus non musculaires et il est maintenant considéré comme une protéine d'échafaudage du cytosquelette sur lequel des complexes de signalisation sont assemblés (Grady, Grange et al. 1999) (Ceccarini, Grasso et al. 2007). α -Dystrobrevine est exprimée dans les muscles squelettiques, le cœur, les poumons et le cerveau, alors que β -dystrobrevine n'est pas exprimé dans les muscles, mais plutôt dans le cerveau, les poumons, les reins et le foie (Blake, Nawrotzki et al. 1996; Sadoulet-Puccio, Khurana et al. 1996; Peters, O'Brien et al. 1997; Blake, Nawrotzki et al. 1998). Étant donné que les dystrobrevines ne possèdent aucune activité enzymatique en soi, leurs implications dans les voies de signalisation seraient dépendantes d'interaction avec d'autres protéines (Ceccarini, Grasso et al. 2007). En effet, comme dystrophine, α et β dystrobrevines peuvent se lier avec une ou deux molécules de syntrophine (Grady, Grange et al. 1999; Loh, Nebenius-Oosthuizen et al. 2001). Ces dernières protéines recrutent à leur tour

d'autres molécules de signalisation au DGC, comme les protéines kinases, nNOS, canaux ioniques et des récepteurs membranaires (Albrecht and Froehner 2002). Les composantes du DGC sont la cible de différentes kinases qui régulent la dynamique de leurs interactions. D'ailleurs, la phosphorylation de α dystrobrevine aux jonctions neuromusculaires serait un rôle clé dans la régulation du remodelage synaptique (Grady, Akaaboune et al. 2003).

Le rôle des dystrobrevines dans la signalisation cellulaire commence à être mieux connu grâce aux études de leurs partenaires de liaison : syncoilin, desmuslin, DAMAGE, dysbindin et pancortin (Benson, Newey et al. 2001; Mizuno, Thompson et al. 2001; Newey, Howman et al. 2001; Albrecht and Froehner 2004; Veroni, Grasso et al. 2007). Les dystrobrevines se lient au domaine de liaison cargo de la chaîne lourde de kinésine et, *in vitro*, β dystrobrevine phosphorylée se lie moins bien à la kinésine (Macioce, Gambarà et al. 2003; Ceccarini, Grasso et al. 2007). Cette interaction pourrait jouer un rôle dans le transport intracellulaire. Il est donc possible que l'interaction entre *gdi-1* et *dyb-1* soit conservée chez l'humain et que cette interaction se fasse via les protéines motrices kinésines.

α et β Dystrobrevines interagissent physiquement avec 2 sous-unités régulatrices de protéine kinase A cAMP-dépendant (PKA), qui sont toutes deux exprimées dans le cerveau. La phosphorylation par PKA joue un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques tels que la prolifération cellulaire et le métabolisme (Skalhegg and Tasken 2000), ainsi que dans d'autres fonctions plus évoluées telles que l'apprentissage et la mémoire (Kandel 2001). Les différentes phosphorylations sont contrôlées par la compartimentation des protéines kinases et des phosphatases grâce aux protéines d'échafaudage et d'encrage. Il a même été suggéré que lorsque le stimulus intra ou extra cellulaire atteint le compartiment en question et active les composantes de signalisation, les protéines d'échafaudage peuvent elles-mêmes être la cible des kinases et phosphatases (Ceccarini, Grasso et al. 2007). Il a aussi été montré que les protéines d'échafaudage ne servent pas seulement à des ancrages

stationnaires dans les cellules, mais aussi en tant que composantes dynamiques de signalisation (Smith, Gibson et al. 2006). Le fait que la phosphorylation de β dystrobrevine par PKA montre une réduction de l'affinité pour la kinésine suggère que cette phosphorylation pourrait réguler le processus de livraison du cargo. Cela renforce l'hypothèse que la phosphorylation via PKA joue un rôle dans l'interaction entre kinésine et dystrobrevine (Ceccarini, Torreri et al. 2005). L'actine et nNOS sont connus pour être phosphorylés par PKA (Brune and Lapetina 1991) et dystrobrevine pourrait lier PKA à ces deux composantes. (Ceccarini, Grasso et al. 2007) Donc, tous ces résultats montrent que dystrobrevine est non seulement un membre important du DGC, mais aussi une protéine multifonctionnelle suggérant un rôle dans différents processus cellulaires incluant le transport intracellulaire et la signalisation cellulaire (Ceccarini, Grasso et al. 2007).

Les agents ML-7 et blebbistatine chez le modèle de dégénérescence musculaire chez *C. elegans*

Ces deux agents n'ont pas été testés dans le modèle de dégénérescence musculaire. Rappelons que ces agents suppriment des phénotypes causés par *gdi-1* (ARNi) et que nous avons montré que *gdi-1* interagit avec *dyb-1* dans le modèle de dégénérescence musculaire. Il serait intéressant de voir l'effet de ces agents dans ce modèle, car comme DYB-1 et GDI-1, ML-7 et blebbistatine interagissent avec le cytosquelette. Il est donc pertinent de faire un tel test, d'autant plus qu'il serait expérimentalement simple de le faire.

Les microtubules seraient un lien dans l'interaction entre *gdi-1* et *aspm-1*

Comme nous l'avons montré, un autre gène qui interagit avec *gdi-1* est *aspm-1* (*abnormal spindle-like, microcephaly-associated*). Tel que l'indique son appellation, ASPM est associé à la microcéphalie, maladie qui est caractérisée par une diminution de la croissance du cerveau (Bond, Roberts et al. 2002). Ce gène joue un

rôle dans la formation fuseau mitotique. Ce fuseau est responsable du plan de division de la cellule, ce qui est important pour le choix entre la division symétrique ou asymétrique (van der Voet, Berends et al. 2009). ASPM affecterait le ratio entre la prolifération et la division asymétrique neurogénique des précurseurs neuronaux lors du développement du cerveau (Fish, Kosodo et al. 2006). Chez *C. elegans*, le fuseau mitotique est plus grand que normal et désorganisé dans l'embryon de *aspm-1* (ARNi) (van der Voet, Berends et al. 2009). ASPM-1 et d'autres protéines, dont la protéine motrice dynéine, participent au positionnement du fuseau mitotique (van der Voet, Berends et al. 2009) (Figure 4.5). Chez *C. elegans*, les gènes *aspm-1* et *gdi-1* jouent des rôles importants dans le système reproducteur alors que chez l'humain, leurs homologues sont importants pour le cerveau. Il serait intéressant de vérifier si *GDII* et ASPM interagissent dans les cerveaux de mammifères et si l'altération simultanée des deux gènes diminuait les symptômes cognitifs associés aux mutations dans l'un ou l'autre des deux gènes.

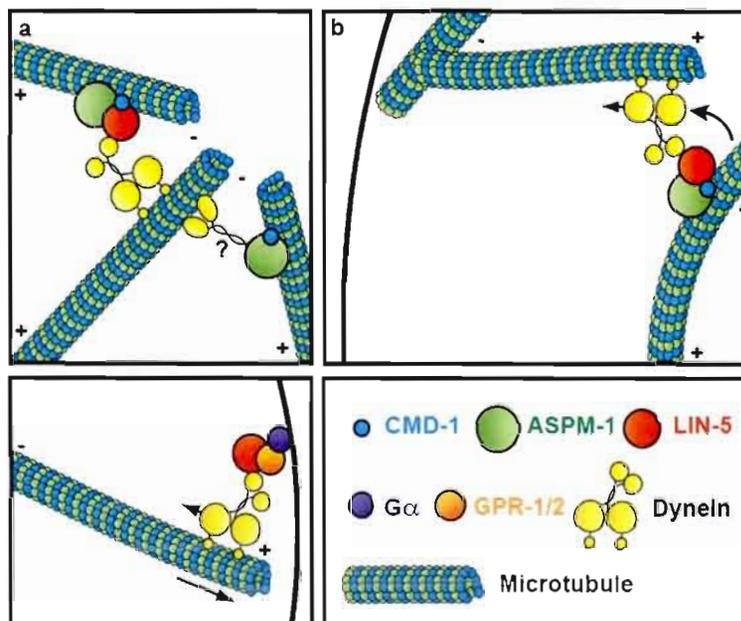


Figure 4.5 ASPM-1 interagit avec notamment la protéine motrice dynéine et les microtubules du positionnement du fuseau mitotique. Tiré de (van der Voet, Berends et al. 2009)

L'antagonisme de *gdi-1* et *tra-4*

Contrairement aux autres gènes mentionnés précédemment qui interagissent avec *gdi-1*, *tra-4* est le seul qui n'interagit apparemment pas directement ou indirectement avec une protéine motrice. En effet, DYB-1 interagit avec la protéine kinesine, UNC-89 avec la myosine et ASPM-1 avec dynéine. (Benian, Tinley et al. 1996; Ceccarini, Torreri et al. 2005; van der Voet, Berends et al. 2009) *tra-4* est un gène qui code pour un répresseur de transcription qui favorise le développement en femelle en réprimant les gènes spécifiques au développement du mâle. Ce gène est aussi caractérisé en tant que gène de la classe SynMuvB, qui régule négativement le développement de la vulve des nématodes (Grote and Conradt 2006) et dont certains gènes contrôlent aussi le développement de la gonade somatique (Bender, Kirienko et al. 2007). Donc en plus de *tra-4*, il est possible que d'autres gènes SynMuvB interagissent génétiquement avec *gdi-1* lors du développement de la gonade somatique. Plusieurs de ces gènes incluant *tra-4* sont des orthologues de gènes humains contrôlant le développement neuronal (Avantaggiato, Pandolfi et al. 1995; McLearn, Garcia-Fresco et al. 2006; Aucott, Bullwinkel et al. 2008). Donc si les interactions antagonistes entre *gdi-1* et les gènes SynMuvB sont conservés chez l'humain, ces gènes pourraient être des cibles thérapeutiques contre le RM associé à *GDII*.

Les RabGDIs joueraient un rôle primordiale dans la morphologie cellulaire

Au départ de cette étude, nous avons fait l'hypothèse que α GDI pouvait réguler l'adressage/recyclage d'un ou plusieurs récepteur(s) de neurotransmetteurs, et que le RM occasionné par le manque de α GDI pouvait être causé par un transport inadéquat de ce(s) récepteur(s). Cependant, comme potentiellement toutes les Rabs peuvent être régulées par α GDI et que le rôle des Rabs ne se résume pas seulement qu'au transport des récepteurs de neurotransmetteurs, la pathologie ne peut s'expliquer que par un rôle aussi spécifique. D'ailleurs, l'équipe de D'Adamo a

étudié pendant plusieurs années *Gdi-1* chez la souris, sans y trouver un rôle spécifique dans le transport d'un cargo en particulier. Ils ont notamment montré que la pathologie du RM causée par *GDI1* ne peut s'expliquer par le fait qu'il y a une défectuosité d'exocytose de neurotransmetteurs dans la fente synaptique via la régulation de Rab-3A (D'Adamo, Wolfer et al. 2004).

Quel est le lien entre le système reproducteur de *C. elegans* et le cerveau chez les mammifères que le manque de GDI-1/ α GDI pourrait perturber?

Nous proposons ici que la morphologie cellulaire puisse être la réponse à cette question. En effet, la migration cellulaire et les changements de morphologie sont des processus importants pour le développement du cerveau ainsi que la plasticité synaptique, de même que pour la migration des DTCs, pendant l'élongation de la gonade lors de la gonadogenèse. Nous croyons que GDI-1/ α GDI joueraient un rôle primordial dans la morphologie cellulaire.

Beaucoup de processus doivent être coordonnés pour générer un organe complexe. Au niveau cellulaire, ces processus incluent évidemment la prolifération et la différenciation, mais aussi la modulation de la morphologie cellulaire et la migration cellulaire (Miskowski, Li et al. 2001). Ces 3 derniers processus impliquent le cytosquelette.

Lors de la formation du cerveau et lors de la plasticité synaptique, les neurones subissent une migration cellulaire et des changements morphologiques importants. Le cytosquelette et le transport vésiculaire jouent un rôle important dans ces changements. Lors de la migration, les cellules génèrent des extensions orientées de lamellipode. Ces lamellipodes se forment par une forte polymérisation d'actine et par un bourgeonnement de membranes, grâce à l'apport de vésicules (Lanzetti 2007). L'exocytose et l'endocytose sont des processus très importants pour la locomotion cellulaire. Non seulement en procurant de nouvelles membranes pour

l'extension, mais aussi pour l'internalisation et le recyclage des structures adhésives (Lanzetti 2007) (Figure 4.6). Les filaments d'actines (F-actine) subissent un roulement important, procurant ainsi une plasticité aux dendrites (Star, Kwiatkowski et al. 2002; Cingolani and Goda 2008). Ils jouent aussi un rôle important dans l'efficacité synaptique en favorisant un trafic approprié des récepteurs dans les épines dendritiques (Cingolani and Goda 2008). Les protéines des densités post-synaptiques (PSD) sont des protéines spécialisées du cytosquelette qui assemblent des récepteurs aux PSDs pour médier la fonction synaptique. Les PSD contiennent des filaments intermédiaires, des microtubules et des F-actines qui lient des protéines synaptiques (Georges, Hadzimichalis et al. 2008). Les NMDA-R et GABA-R sont adéquatement localisés seulement si le cytosquelette d'actines et de microtubules sont intacts (Allison, Chervin et al. 2000). La protéine PSD-95 est une composante essentielle du PSD excitateur et joue un rôle dans l'apprentissage et la mémorisation (Migaud, Charlesworth et al. 1998).

Afin de mieux comprendre la migration cellulaire, une étude à l'échelle du génome, grâce à l'ARNi, a été réalisée chez *C. elegans* afin de déterminer les gènes ayant un rôle dans la migration des DTCs lors de la gonadogenèse. La classe des gènes la plus abondante ayant un tel rôle à jouer fut celle de l'architecture cellulaire. D'ailleurs, la diminution d'expression des gènes de l'actine et de la tubuline altère sévèrement la migration cellulaire (Cram, Shang et al. 2006).

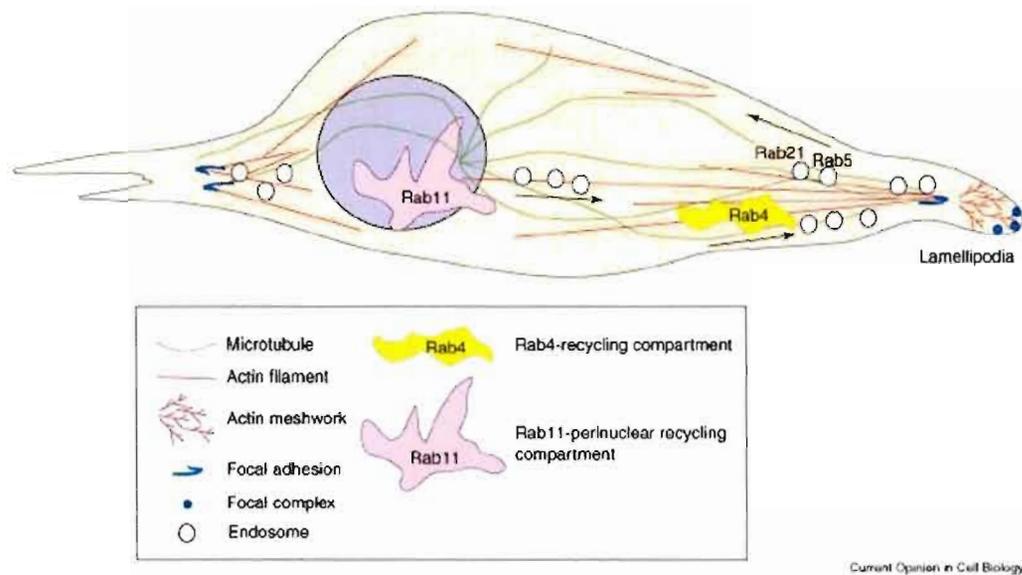


Figure 4.6 L'implication des Rabs et du cytosquelette dans la migration cellulaire. Le trafic des protéines intégrines se fait via les Rabs qui voyagent sur le cytosquelette. L'actine se polymérise dans le lamellipode en croissance. Tiré de (Lanzetti 2007)

Donc les Rabs, le cytosquelette et les protéines motrices jouent des rôles importants dans la morphologie des neurones. Il est donc tout à fait possible qu'il en soit de même pour GDI-1.

L'homologue de dystroglycan (un composant important du DGC) chez *C. elegans*, DGN-1, est exprimé dans l'épithélium et les neurones, mais pas dans les muscles. Cette protéine est essentielle pour la migration des axones et de la gonade (Johnson, Kang et al. 2006). Donc si DGN-1 contrôle la migration de la gonade de la même façon qu'il contrôle la migration neuronale, ceci nous permet de nous demander si la migration des axones et celles des gonades font appel aux mêmes mécanismes de signalisation.

gdi-1 et le cytosquelette

Nous avons remarqué une différence de morphologie des oocytes *gdi-1* (ARNi), suggérant un problème au niveau du réarrangement du cytosquelette. Cette observation montre une fois de plus l'importance de l'interaction entre *gdi-1* et le cytosquelette.

Perspectives

Il serait intéressant d'observer la morphologie des gonades chez *gdi-1* (ARNi) à différents stades de développement afin d'identifier à quelle étape le problème survient. Cela permettrait de vérifier qu'il s'agit bel et bien d'un problème de migration des DTCs pendant le développement et non un changement de morphologie de la gonade lors de la vie adulte.

Il serait aussi intéressant de commencer le traitement *gdi-1* (ARNi) plus tard pendant le développement larvaire au lieu de le faire au premier stade larvaire. Ce changement devrait ainsi éviter un effet de *gdi-1* (ARNi) sur la gonadogenèse. Ceci permettrait de déterminer si les phénotypes de *gdi-1* (ARNi) sont causés davantage par des processus biologiques de la vie adulte (e.g., maturation des oocytes et ovulation/contraction de la gonade) que par des perturbations au niveau du développement (e.g., gonadogenèse). De plus, cela permettrait de déterminer dans quelle mesure les problèmes de maturation et d'ovulation sont des conséquences de problème(s) au niveau du développement. Autrement dit, si le phénotype Emo et la diminution de la contraction de la gonade sont des conséquences du phénotype Gon.

Ensuite, il serait pertinent d'observer certains phénotypes de *gdi-1* (ARNi) chez les souches *rrf-1(pk1417)* et *ppw-1(pk2505)* qui sont résistants à l'ARNi dans les cellules somatique et germinales, respectivement. Nous avons déjà observé que les phénotypes Ste, Gon et Emo étaient grandement diminués dans la souche *rrf-1(pk1417)*, mais nous n'avons pas évalué d'autres phénotypes tels que la

morphologie des oocytes, la contraction de la gonade et l'endocytose des lipoprotéines yolk dans l'oocyte. Ces observations permettraient de mieux comprendre le rôle de *gdi-1* dans la maturation des oocytes. Par exemple, si *gdi-1* a bel et bien un rôle crucial à jouer dans le réarrangement du cytosquelette avant l'ovulation, les anomalies de morphologie des oocytes devraient être présents que dans la souche qui est résistante à l'ARNi au niveau somatique et non celle qui est résistante au niveau germinale. Le même raisonnement s'appliquerait à l'endocytose des lipoprotéines yolk. De plus, cela permettrait de vérifier si le phénotype de diminution de contraction de la gonade résulte d'une altération de la fonction de *gdi-1* dans les cellules myoépithéliales de la gaine de la gonade ou est lié à un défaut de maturation des oocytes.

Afin de mieux comprendre le rôle de *gdi-1* dans les différents processus biologiques discutés dans cette étude, il serait intéressant d'observer les phénotypes de *gdi-1* (ARNi) lorsque les différents partenaires potentiels de *gdi-1* sont ciblés, soit par mutations, ARNi ou par agents chimiques/pharmacologiques/inhibiteurs. Nous avons déjà observé certains de ces phénotypes chez les mutants pour les gènes prédits par le modèle bioinformatique, mais il serait pertinent de cibler aussi les différentes Rabs, les protéines motrices, et les protéines du cytosquelette. D'ailleurs, étant donné que *gdi-1* (ARNi) supprime la dystrophie musculaire chez *C. elegans*, ces différentes interventions pourront aussi être testées pour trouver des suppresseurs de la dystrophie musculaire chez *C. elegans*.

Par ailleurs, il pourrait être utile d'évaluer des phénotypes post développementaux tels que la durée de vie et la réponse au stress afin de compléter la caractérisation de *gdi-1*.

Enfin, notre équipe tente présentement de créer un transgénique chez *C. elegans* permettant de produire une protéine fluorescente en fusion avec GDI-1. Ce transgénique servirait notamment à observer le niveau d'expression tissulaire de

GDI-1 en fonction du temps, ainsi que sa localisation subcellulaire et sa colocalisation avec d'autres partenaires fonctionnels potentiels.

Cette étude a permis d'obtenir plusieurs renseignements sur *gdi-1*. Il sera intéressant d'utiliser ces informations pour mieux comprendre le rôle de *Gdi-1* et la dystrophie musculaire chez la souris voir même dans des modèles de culture cellulaire. L'idée étant de passer ultimement chez l'humain.

Conclusion

Nous avons caractérisé *gdi-1* chez *C. elegans*, gène qui est relié au RM chez l'humain. C'est en créant notre propre modèle bioinformatique que nous avons prédit des interactions génétiques avec *gdi-1*. Ces prédictions se sont avérées vrai à 42%, ce qui est un bon taux comparé aux études antérieurs. Quatre des cinq gènes qui interagissent fonctionnellement avec *gdi-1* interagissent aussi physiquement d'une façon directe ou indirecte avec des protéines motrices. Deux de ces gènes sont aussi associés à des problèmes au niveau du cerveau. Les Rabs, les protéines motrices ainsi que le cytosquelette jouent des rôles importants dans la plasticité synaptique, la morphologie des synapses et la migration neuronale. Nous proposons donc que α GDI serait important pour la morphologie et la migration neuronale probablement d'une façon similaire à *gdi-1* qui joue un rôle important dans la migration des DTCs et la morphologie des oocytes. Le système reproducteur de *C. elegans* serait donc un bon modèle pour étudier le RM relié à *GDI1*. Notre étude nous a aussi permis de montrer que non seulement la mutation dans le gène *dyb-1* réduit les phénotypes causés par l'ARNi contre *gdi-1* mais que cette diminution d'expression diminue le phénotype de dystrophie musculaire présente chez les mutants *dyb-1/hlh-1* et *dys-1/hlh-1*. *GDI-1* devient donc une cible thérapeutique contre la dystrophie musculaire, maladie dont il n'existe pratiquement aucun traitement. Enfin nous avons identifié une famille d'agents actifs pouvant être testée contre les déficits neurologiques associés à la délétion fonctionnelle de *GDI-1* chez la souris.

Références

- Akaaboune, M., R. M. Grady, et al. (2002). "Neurotransmitter receptor dynamics studied in vivo by reversible photo-unbinding of fluorescent ligands." Neuron **34**(6): 865-76.
- Allison, D. W., A. S. Chervin, et al. (2000). "Postsynaptic scaffolds of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal neurons: maintenance of core components independent of actin filaments and microtubules." J Neurosci **20**(12): 4545-54.
- Alory, C. and W. E. Balch (2001). "Organization of the Rab-GDI/CHM superfamily: the functional basis for choroideremia disease." Traffic **2**(8): 532-43.
- Anderson, J. L., S. I. Head, et al. (2002). "Brain function in Duchenne muscular dystrophy." Brain **125**(Pt 1): 4-13.
- Artal-Sanz, M., L. de Jong, et al. (2006). "Caenorhabditis elegans: a versatile platform for drug discovery." Biotechnol J **1**(12): 1405-18.
- Aucott, R., J. Bullwinkel, et al. (2008). "HP1-beta is required for development of the cerebral neocortex and neuromuscular junctions." J Cell Biol **183**(4): 597-606.
- Avantaggiato, V., P. P. Pandolfi, et al. (1995). "Developmental analysis of murine Promyelocyte Leukemia Zinc Finger (PLZF) gene expression: implications for the neuromeric model of the forebrain organization." J Neurosci **15**(7 Pt 1): 4927-42.
- Avery, L. and S. Wasserman (1992). "Ordering gene function: the interpretation of epistasis in regulatory hierarchies." Trends Genet **8**(9): 312-6.
- Bachner, D., Z. Sedlacek, et al. (1995). "Expression patterns of two human genes coding for different rab GDP-dissociation inhibitors (GDIs), extremely conserved proteins involved in cellular transport." Hum Mol Genet **4**(4): 701-8.
- Bender, A. M., N. V. Kirienko, et al. (2007). "lin-35/Rb and the CoREST ortholog spr-1 coordinately regulate vulval morphogenesis and gonad development in C. elegans." Dev Biol **302**(2): 448-62.
- Benian, G. M., T. L. Tinley, et al. (1996). "The Caenorhabditis elegans gene unc-89, required for muscle M-line assembly, encodes a giant modular protein composed of Ig and signal transduction domains." J Cell Biol **132**(5): 835-48.
- Berry, L. W., B. Westlund, et al. (1997). "Germ-line tumor formation caused by activation of glp-1, a Caenorhabditis elegans member of the Notch family of receptors." Development **124**(4): 925-36.
- Bianchi, V., P. Farisello, et al. (2009). "Cognitive impairment in Gdi1-deficient mice is associated with altered synaptic vesicle pools and short-term synaptic plasticity, and can be corrected by appropriate learning training." Hum Mol Genet **18**(1): 105-17.

- Blake, D. J. and S. Kroger (2000). "The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle?" Trends Neurosci **23**(3): 92-9.
- Blake, D. J., R. Nawrotzki, et al. (1998). "beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 241-6.
- Blake, D. J., R. Nawrotzki, et al. (1996). "Isoform diversity of dystrobrevin, the murine 87-kDa postsynaptic protein." J Biol Chem **271**(13): 7802-10.
- Blake, D. J., A. Weir, et al. (2002). "Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle." Physiol Rev **82**(2): 291-329.
- Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-9.
- Bond, J., E. Roberts, et al. (2002). "ASPM is a major determinant of cerebral cortical size." Nat Genet **32**(2): 316-20.
- Bonhoeffer, T. and R. Yuste (2002). "Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function." Neuron **35**(6): 1019-27.
- Brenner, S. (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." Genetics **77**(1): 71-94.
- Bridgman, P. C. (2004). "Myosin-dependent transport in neurons." J Neurobiol **58**(2): 164-74.
- Brown, T. C., I. C. Tran, et al. (2005). "NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD." Neuron **45**(1): 81-94.
- Brune, B. and E. G. Lapetina (1991). "Phosphorylation of nitric oxide synthase by protein kinase A." Biochem Biophys Res Commun **181**(2): 921-6.
- Caruso, M. E., S. Jenna, et al. (2008). "GTPase-mediated regulation of the unfolded protein response in *Caenorhabditis elegans* is dependent on the AAA+ ATPase CDC-48." Mol Cell Biol **28**(13): 4261-74.
- Caviston, J. P. and E. L. Holzbaur (2006). "Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport." Trends Cell Biol **16**(10): 530-7.
- Ceccarini, M., M. Grasso, et al. (2007). "Association of dystrobrevin and regulatory subunit of protein kinase A: a new role for dystrobrevin as a scaffold for signaling proteins." J Mol Biol **371**(5): 1174-87.
- Ceccarini, M., P. Torrieri, et al. (2005). "Molecular basis of dystrobrevin interaction with kinesin heavy chain: structural determinants of their binding." J Mol Biol **354**(4): 872-82.
- Cingolani, L. A. and Y. Goda (2008). "Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy." Nat Rev Neurosci **9**(5): 344-56.
- Corbeel, L. and K. Freson (2008). "Rab proteins and Rab-associated proteins: major actors in the mechanism of protein-trafficking disorders." Eur J Pediatr **167**(7): 723-9.
- Cram, E. J., H. Shang, et al. (2006). "A systematic RNA interference screen reveals a cell migration gene network in *C. elegans*." J Cell Sci **119**(Pt 23): 4811-8.
- Crittenden, S. L., K. A. Leonhard, et al. (2006). "Cellular analyses of the mitotic region in the *Caenorhabditis elegans* adult germ line." Mol Biol Cell **17**(7): 3051-61.

- Curie, A., S. Sacco, et al. (2009). "Impairment of cerebello-thalamo-frontal pathway in Rab-GDI mutated patients with pure mental deficiency." Eur J Med Genet **52**(1): 6-13.
- Cybulnik, S. E. and V. J. Hinton (2008). "Duchenne muscular dystrophy: a cerebellar disorder?" Neurosci Biobehav Rev **32**(3): 486-96.
- D'Adamo, P., A. Menegon, et al. (1998). "Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation." Nat Genet **19**(2): 134-9.
- D'Adamo, P., H. Welzl, et al. (2002). "Deletion of the mental retardation gene Gdi1 impairs associative memory and alters social behavior in mice." Hum Mol Genet **11**(21): 2567-80.
- D'Adamo, P., D. P. Wolfer, et al. (2004). "Mice deficient for the synaptic vesicle protein Rab3a show impaired spatial reversal learning and increased explorative activity but none of the behavioral changes shown by mice deficient for the Rab3a regulator Gdi1." Eur J Neurosci **19**(7): 1895-905.
- Duchenne, G. B. (1868). "Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myosclerosique." Archives of General Medicine **11**: 5-25.
- Dunaevsky, A., A. Tashiro, et al. (1999). "Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13438-43.
- Erdman, R. A. and W. A. Maltese (2001). "Different Rab GTPases associate preferentially with alpha or beta GDP-dissociation inhibitors." Biochem Biophys Res Commun **282**(1): 4-9.
- Faber, P. W., J. R. Alter, et al. (1999). "Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(1): 179-84.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-11.
- Fish, J. L., Y. Kosodo, et al. (2006). "Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(27): 10438-43.
- Gaud, A., J. M. Simon, et al. (2004). "Prednisone reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*." Neuromuscul Disord **14**(6): 365-70.
- Georges, P. C., N. M. Hadzimidichalis, et al. (2008). "The yin-yang of dendrite morphology: unity of actin and microtubules." Mol Neurobiol **38**(3): 270-84.
- Gilbert, S. F. and J. A. Bolker (2001). "Homologies of process and modular elements of embryonic construction." J Exp Zool **291**(1): 1-12.
- Grant, B. and D. Hirsh (1999). "Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte." Mol Biol Cell **10**(12): 4311-26.
- Grote, P. and B. Conradt (2006). "The PLZF-like protein TRA-4 cooperates with the Gli-like transcription factor TRA-1 to promote female development in *C. elegans*." Dev Cell **11**(4): 561-73.

- Harris, T. W., N. Chen, et al. (2004). "WormBase: a multi-species resource for nematode biology and genomics." Nucleic Acids Res **32**(Database issue): D411-7.
- Hesselson, D., C. Newman, et al. (2004). "GON-1 and fibulin have antagonistic roles in control of organ shape." Curr Biol **14**(22): 2005-10.
- Hirokawa, N. and R. Takemura (2004). "Molecular motors in neuronal development, intracellular transport and diseases." Curr Opin Neurobiol **14**(5): 564-73.
- Hirokawa, N. and R. Takemura (2005). "Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons." Nat Rev Neurosci **6**(3): 201-14.
- Hodgkin, J. (2005). "Genetic suppression." WormBook: 1-13.
- Huang, C. C., J. L. You, et al. (2004). "Rap1-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation facilitates AMPA receptor trafficking via the GDI.Rab5 complex. Potential role in (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine-induced long term depression." J Biol Chem **279**(13): 12286-92.
- Huang, J., T. Imamura, et al. (2001). "Insulin can regulate GLUT4 internalization by signaling to Rab5 and the motor protein dynein." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 13084-9.
- Hubbard, E. J. and D. Greenstein (2000). "The *Caenorhabditis elegans* gonad: a test tube for cell and developmental biology." Dev Dyn **218**(1): 2-22.
- Humeau, Y., F. Gambino, et al. (2009). "X-linked mental retardation: focus on synaptic function and plasticity." J Neurochem **109**(1): 1-14.
- Imamura, T., J. Huang, et al. (2003). "Insulin-induced GLUT4 translocation involves protein kinase C-lambda-mediated functional coupling between Rab4 and the motor protein kinesin." Mol Cell Biol **23**(14): 4892-900.
- Inlow, J. K. and L. L. Restifo (2004). "Molecular and comparative genetics of mental retardation." Genetics **166**(2): 835-81.
- Ishizaki, H., J. Miyoshi, et al. (2000). "Role of rab GDP dissociation inhibitor alpha in regulating plasticity of hippocampal neurotransmission." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(21): 11587-92.
- Iwasaki, K., J. McCarter, et al. (1996). "emo-1, a *Caenorhabditis elegans* Sec61p gamma homologue, is required for oocyte development and ovulation." J Cell Biol **134**(3): 699-714.
- Jordens, I., M. Marsman, et al. (2005). "Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion." Traffic **6**(12): 1070-7.
- Kamath, R. S., A. G. Fraser, et al. (2003). "Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi." Nature **421**(6920): 231-7.
- Kamath, R. S., M. Martinez-Campos, et al. (2001). "Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Genome Biol **2**(1): RESEARCH0002.
- Kandel, E. R. (2001). "The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses." Science **294**(5544): 1030-8.

- Kawamoto, S. and R. S. Adelstein (1991). "Chicken nonmuscle myosin heavy chains: differential expression of two mRNAs and evidence for two different polypeptides." *J Cell Biol* **112**(5): 915-24.
- Kim, H., M. J. Rogers, et al. (2004). "SNF-6 is an acetylcholine transporter interacting with the dystrophin complex in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **430**(7002): 891-6.
- Kirschner, M. and T. Mitchison (1986). "Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis." *Cell* **45**(3): 329-42.
- Kitano, H. (2002). "Systems biology: a brief overview." *Science* **295**(5560): 1662-4.
- Kopan, R. and M. X. Ilagan (2009). "The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism." *Cell* **137**(2): 216-33.
- Lanzetti, L. (2007). "Actin in membrane trafficking." *Curr Opin Cell Biol* **19**(4): 453-8.
- Levitani, D. and I. Greenwald (1995). "Facilitation of *lin-12*-mediated signalling by *sel-12*, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene." *Nature* **377**(6547): 351-4.
- Link, C. D. (1995). "Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20): 9368-72.
- Lonart, G., R. Janz, et al. (1998). "Mechanism of action of *rab3A* in mossy fiber LTP." *Neuron* **21**(5): 1141-50.
- McAllister, A. K. (2000). "Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth." *Cereb Cortex* **10**(10): 963-73.
- McCarter, J., B. Bartlett, et al. (1997). "Soma-germ cell interactions in *Caenorhabditis elegans*: multiple events of hermaphrodite germline development require the somatic sheath and spermathecal lineages." *Dev Biol* **181**(2): 121-43.
- McCarter, J., B. Bartlett, et al. (1999). "On the control of oocyte meiotic maturation and ovulation in *Caenorhabditis elegans*." *Dev Biol* **205**(1): 111-28.
- McLear, J. A., G. Garcia-Fresco, et al. (2006). "In vivo inactivation of pRb, p107 and p130 in murine neuroprogenitor cells leads to major CNS developmental defects and high seizure rates." *Mol Cell Neurosci* **33**(3): 260-73.
- Medeiros, N. A., D. T. Burnette, et al. (2006). "Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones." *Nat Cell Biol* **8**(3): 215-26.
- Miczek, K. A., S. C. Maxson, et al. (2001). "Aggressive behavioral phenotypes in mice." *Behav Brain Res* **125**(1-2): 167-81.
- Migaud, M., P. Charlesworth, et al. (1998). "Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein." *Nature* **396**(6710): 433-9.
- Miller, M. A., P. J. Ruest, et al. (2003). "An Eph receptor sperm-sensing control mechanism for oocyte meiotic maturation in *Caenorhabditis elegans*." *Genes Dev* **17**(2): 187-200.
- Miskowski, J., Y. Li, et al. (2001). "The *sys-1* gene and sexual dimorphism during gonadogenesis in *Caenorhabditis elegans*." *Dev Biol* **230**(1): 61-73.

- Mitani, S. (2000). National Biosource Project. Tokyo.
- Moizard, M. P., C. Billard, et al. (1998). "Are Dp71 and Dp140 brain dystrophin isoforms related to cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy?" Am J Med Genet **80**(1): 32-41.
- Moore, S. W., M. Tessier-Lavigne, et al. (2007). "Netrins and their receptors." Adv Exp Med Biol **621**: 17-31.
- Myers, K. A., I. Tint, et al. (2006). "Antagonistic forces generated by cytoplasmic dynein and myosin-II during growth cone turning and axonal retraction." Traffic **7**(10): 1333-51.
- Ng, E. L. and B. L. Tang (2008). "Rab GTPases and their roles in brain neurons and glia." Brain Res Rev **58**(1): 236-46.
- Ono, K. and S. Ono (2004). "Tropomyosin and troponin are required for ovarian contraction in the *Caenorhabditis elegans* reproductive system." Mol Biol Cell **15**(6): 2782-93.
- Ono, K., R. Yu, et al. (2007). "Structural components of the nonstriated contractile apparatuses in the *Caenorhabditis elegans* gonadal myoepithelial sheath and their essential roles for ovulation." Dev Dyn **236**(4): 1093-105.
- Pereira-Leal, J. B., A. N. Hume, et al. (2001). "Prenylation of Rab GTPases: molecular mechanisms and involvement in genetic disease." FEBS Lett **498**(2-3): 197-200.
- Pessin, J. E., D. C. Thurmond, et al. (1999). "Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location!" J Biol Chem **274**(5): 2593-6.
- Peters, M. F., K. F. O'Brien, et al. (1997). "beta-dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification, cloning, and protein associations." J Biol Chem **272**(50): 31561-9.
- Pfeffer, S. and D. Aivazian (2004). "Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 886-96.
- Rees, M. L., C. F. Lien, et al. (2007). "Dystrobrevins in muscle and non-muscle tissues." Neuromuscul Disord **17**(2): 123-34.
- Reilein, A. R., I. S. Tint, et al. (1998). "Regulation of organelle movement in melanophores by protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), and protein phosphatase 2A (PP2A)." J Cell Biol **142**(3): 803-13.
- Riddle, D. L., T. Blumenthal, et al., Eds. (1997). *C. elegans II*, cold spring harbor laboratory press
- Rual, J. F., J. Ceron, et al. (2004). "Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library." Genome Res **14**(10B): 2162-8.
- Ryu, J., L. Liu, et al. (2006). "A critical role for myosin IIb in dendritic spine morphology and synaptic function." Neuron **49**(2): 175-82.
- Sadoulet-Puccio, H. M., T. S. Khurana, et al. (1996). "Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the

- Torpedo electric organ post-synaptic membrane." *Hum Mol Genet* **5**(4): 489-96.
- Sasaki, T., A. Kikuchi, et al. (1990). "Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein." *J Biol Chem* **265**(4): 2333-7.
- Sato, K., M. Sato, et al. (2006). "Dynamic regulation of caveolin-1 trafficking in the germ line and embryo of *Caenorhabditis elegans*." *Mol Biol Cell* **17**(7): 3085-94.
- Schliwa, M. and G. Woehlke (2003). "Molecular motors." *Nature* **422**(6933): 759-65.
- Schluter, O. M., M. Khvotchev, et al. (2002). "Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling fusion." *J Biol Chem* **277**(43): 40919-29.
- Schubert, V. and C. G. Dotti (2007). "Transmitting on actin: synaptic control of dendritic architecture." *J Cell Sci* **120**(Pt 2): 205-12.
- Seabra, M. C., E. H. Mules, et al. (2002). "Rab GTPases, intracellular traffic and disease." *Trends Mol Med* **8**(1): 23-30.
- Sekiguchi, M., K. Zushida, et al. (2009). "A deficit of brain dystrophin impairs specific amygdala GABAergic transmission and enhances defensive behaviour in mice." *Brain* **132**(Pt 1): 124-35.
- Sekino, Y., N. Kojima, et al. (2007). "Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis." *Neurochem Int* **51**(2-4): 92-104.
- Sellers, J. R. (2000). "Myosins: a diverse superfamily." *Biochim Biophys Acta* **1496**(1): 3-22.
- Sherrington, R., E. I. Rogaev, et al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." *Nature* **375**(6534): 754-60.
- Skalhegg, B. S. and K. Tasken (2000). "Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA." *Front Biosci* **5**: D678-93.
- Star, E. N., D. J. Kwiatkowski, et al. (2002). "Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity." *Nat Neurosci* **5**(3): 239-46.
- Su, M., D. C. Merz, et al. (2000). "Regulation of the UNC-5 netrin receptor initiates the first reorientation of migrating distal tip cells in *Caenorhabditis elegans*." *Development* **127**(3): 585-94.
- Tabara, H., M. Sarkissian, et al. (1999). "The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*." *Cell* **99**(2): 123-32.
- Takashima, S. (2009). "Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction." *Circ J* **73**(2): 208-13.
- Timmons, L., D. L. Court, et al. (2001). "Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*." *Gene* **263**(1-2): 103-12.

- Timmons, L. and A. Fire (1998). "Specific interference by ingested dsRNA." Nature **395**(6705): 854.
- Vaillend, C., R. Poirier, et al. (2008). "Genes, plasticity and mental retardation." Behav Brain Res **192**(1): 88-105.
- van der Voet, M., C. W. Berends, et al. (2009). "NuMA-related LIN-5, ASPM-1, calmodulin and dynein promote meiotic spindle rotation independently of cortical LIN-5/GPR/Galpha." Nat Cell Biol **11**(3): 269-77.
- Vaughan, P. S., P. Miura, et al. (2002). "A role for regulated binding of p150(Glued) to microtubule plus ends in organelle transport." J Cell Biol **158**(2): 305-19.
- Zerial, M. and H. McBride (2001). "Rab proteins as membrane organizers." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 107-17.
- Zubov. from www.nida.nih.gov/pubs/teaching.