



HAL
open science

Mécanismes moléculaires associés aux changements d'épissage de Tau dans une Tauopathie, la dystrophie myotonique de type 1

Hélène Tran Tran-Ladam

► **To cite this version:**

Hélène Tran Tran-Ladam. Mécanismes moléculaires associés aux changements d'épissage de Tau dans une Tauopathie, la dystrophie myotonique de type 1. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. Français. NNT : 2010LIL2S037 . tel-00625483

HAL Id: tel-00625483

<https://theses.hal.science/tel-00625483>

Submitted on 21 Sep 2011

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

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

**UNIVERSITÉ LILLE - NORD DE FRANCE
UNIVERSITÉ DROIT ET SANTÉ DE LILLE 2**

École Doctorale Biologie-Santé (ED446)

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 2

Spécialité : Biochimie & Biologie Moléculaire

Présentée par

Hélène TRAN-LADAM

**MÉCANISMES MOLÉCULAIRES ASSOCIÉS AUX CHANGEMENTS D'ÉPISSAGE DE TAU DANS
UNE TAUOPATHIE, LA DYSTROPHIE MYOTONIQUE DE TYPE 1**

Soutenue publiquement le 17 Décembre 2010 devant le Jury composé de :

M. le Dr. Jean-Marc GALLO

M. le Pr. Markus TOLNAY

M. le Dr. Nicolas CHARLET-BERGUERAND

M. le Dr. Denis FURLING

M. le Pr. Patrick VERMERSCH

Mme. le Dr. Susanna SCHRAEN-MASCHKE

M. le Dr. Nicolas SERGEANT

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Co-Directeur de thèse

Co-Directeur de thèse

RESUME

Mécanismes moléculaires associés aux changements d'épissage de Tau dans une Tauopathie, la dystrophie myotonique de type 1

La pathologie Tau est une lésion neuronale commune à plus d'une vingtaine de maladies neurodégénératives. Elle correspond à l'agrégation des protéines Tau anormalement modifiées. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'agrégation de Tau demeurent encore mal compris. Toutefois, parmi les différentes hypothèses étiologiques, celle d'une dérégulation de l'épissage alternatif de Tau nous intéresse tout particulièrement. Ici, nous considérons la dystrophie myotonique de type 1 (DM1) comme maladie « modèle » pour étudier cette relation, puisqu'elle présente à la fois une dérégulation de l'épissage alternatif de Tau et des agrégats Tau. La DM1 est la forme adulte la plus fréquente de dystrophie musculaire. Il s'agit d'une maladie héréditaire à transmission autosomale dominante caractérisée par des répétitions CTG_{n>50} instables localisées dans la région 3'UTR du gène *DMPK*. Les mécanismes impliqués supposent un gain de fonction toxique des ARN mutés conduisant à une modification de l'épissage alternatif de nombreux transcrits parmi lesquels Tau. Dans ce contexte, nos objectifs étaient 1) de caractériser le défaut d'épissage de Tau dans le cerveau de plusieurs cas DM1 2) de modéliser ce défaut d'épissage afin d'identifier les facteurs *trans*-régulateurs impliqués et 3) de proposer une approche visant à restaurer un épissage normal.

Le défaut d'épissage de Tau a été observé dans tous les cas analysés. Celui de l'exon 10, en revanche, n'a été rapporté que chez deux cas, qui, de façon intéressante, présentaient également une augmentation de l'expression des protéines CELF, décrites comme protéines régulatrices de l'épissage de Tau. Outre les protéines CELF, nous nous sommes également intéressés à MBNL1. MBNL1 est un facteur d'épissage jouant un rôle essentiel dans la physiopathologie de la DM1 où il a été décrit comme séquestré dans les *foci*. Peu de choses sont connues sur MBNL1 dans le cerveau et sur son rôle sur l'épissage alternatif des transcrits neuronaux. Ici, nous montrons que le niveau d'expression cérébrale de MBNL1 ne varie pas entre les cas DM1 et contrôles. En revanche, nous montrons que son épissage alternatif est dérégulé dans le cerveau. Notre étude de relation entre la structure et la fonction de la protéine suggère que ce changement d'épissage favorise sa séquestration dans les *foci* en modifiant sa localisation nucléaire, son activité de facteur d'épissage et ses propriétés d'oligomérisation. Le changement d'épissage de MBNL1 n'influence pas celui de Tau. Cependant, sa perte de fonction reproduit un profil d'épissage similaire à celui observé dans les cerveaux DM1. De plus, nous montrons que la surexpression de MBNL1, en présence des répétitions CTG suffit à restaurer un épissage normal de Tau et de plusieurs autres transcrits dérégulés dans la DM1. Enfin, des expériences complémentaires réalisées avec des protéines tronquées non fonctionnelles en tant que facteur d'épissage suggèrent que la restauration d'un profil d'épissage normal dans la DM1 serait due à la saturation des sites de liaisons CUG, ce qui permettrait de libérer les protéines MBNL1 séquestrées. Ces constructions semblent donc présenter un potentiel intérêt pour inverser les changements d'épissage observés dans la DM1 et sont actuellement en cours d'études.

ABSTRACT

Molecular mechanisms related to Tau mis-splicing in a Tauopathy: myotonic dystrophy type 1

Tau pathology is a brain lesion common to more than twenty neurodegenerative disorders. It consists of the abnormal aggregation of the microtubule-associated protein Tau into neurofibrillary tangles. Mechanisms underlying Tau aggregation are not fully understood yet. However, among the different etiological hypotheses, the one of a relationship between Tau mis-splicing and Tau aggregates particularly interests us. Here, we proposed a disease model, being myotonic dystrophy type I (DMI), in which Tau mis-splicing and Tau aggregate occur. DM1 is the most common adult form of muscular dystrophy. It is an inherited autosomal disorder characterised by a dynamic unstable CTG repeats (over 50) in the 3'UTR of *DMPK* gene. DM1 pathogenesis is suggested to result from a RNA toxic gain of function whereby mutant transcripts modify the splicing machinery activity leading thus to a mis-splicing of several pre-mRNA targets including Tau. In this context, our objectives were to 1) characterize Tau mis-splicing in several DM1 brain patients 2) Model it and identify the *trans*-regulating splicing factors likely involved and 3) Propose a therapeutic approach to reverse it.

Tau mis-splicing was always observed for both exons 2 and 3 in human adult DM1 brain and consisted of a reduced inclusion. Tau exon 10 splicing was seldom mis-regulated and associated with an increase of the CELF proteins family. CELF proteins are splicing factors previously described to regulate alternative splicing of Tau exons 2, 3 and 10. In addition to the CELF proteins, we also investigated the potential role of the splicing factor MBNL1, which was shown to play an essential role in DM1 physiopathology through its sequestration by the CUG repeats. MBNL1's brain expression was ill-defined. Here, we report that MBNL1's expression level was not altered but its splicing modified in adult DM1 brain. In addition, we provide evidences by a relationship study between the structure and the function of MBNL1 that this mis-splicing event favored its sequestration to the *foci* by modifying its cell-localization, splicing activity and oligomerization properties. MBNL1 mis-splicing does not influence Tau mis-splicing. However its loss of expression reproduced the mis-splicing of Tau exons 2/3 as observed in DM1 brain. Interestingly, the overexpression of MBNL1 in the presence of the CTG repeats partially restored a normal splicing of Tau as well as several other mis-regulated pre-mRNA targets. Further experiments performed with different molecular constructs lead us to hypothesized that the reversal of the abnormal splicing events observed in DM1 was mediated by a saturation of the CUG binding sites that lead to the release of a free pool of MBNL1, recovering thus its splicing function. This work leads us to design a new molecular tool that might be of interest to reverse the pathological events observed in DM1.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	13
CHAPITRE 1 - TAU : DU GENE A LA PROTEINE.....	15
I. LE GENE.....	15
I. A. La localisation chromosomique	15
I. B La région promotrice du gène <i>MAPT</i>	15
I. C. Le polymorphisme du gène <i>MAPT</i>	16
II. LES TRANSCRITS.....	17
II. A Généralités sur l'épissage alternatif	17
<i>II. A. 1 L'épissages de l'ARN pré-messager</i>	17
<i>II. A. 2 Mécanisme et régulation de l'épissage alternatif</i>	17
II. B Epissage alternatif de Tau dans le cerveau	18
<i>II. B. 1. Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 2</i>	19
<i>II. B. 2 Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 3</i>	20
<i>II. B. 3 Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 10</i>	20
II. C Polyadénylation des transcrits	22
III. LES PROTEINES TAU.....	23
III. A Structure des protéines Tau	24
III. B Fonctions principales de Tau et modulation par l'épissage alternatif	24
<i>III. B. 1 Fonctions associées au domaine de liaison aux microtubules</i>	24
III. B. 1. a Polymérisation et stabilisation des microtubules	24
III. B. 1. b polarité neuronale	25
<i>III. B. 2 Fonctions associées au compartiment axonal : régulation du transport</i>	25
<i>III. B. 3 Fonctions associées à la localisation de Tau à la membrane plasmique</i>	27
<i>III. B. 4 Fonctions associées à la localisation de Tau au noyau</i>	28
III. C Modifications post-traductionnelles : phosphorylation de Tau	28
CHAPITRE 2 - TAU : DE LA PROTEINE A LA PATHOLOGIE.....	30
I. LES PROTEINES TAU PATHOLOGIQUES	30
II. LA PATHOLOGIE TAU COMME MARQUEUR DE MALADIES NEURODEGENERATIVES.....	31
II. A Distribution topographique et laminaire	32
II. B Aspects et composition biochimique des agrégats Tau	34
III. LA PATHOLOGIE TAU ET EPISSAGE ALTERNATIF.....	37
III. A Dérégulation en <i>cis</i>	37
<i>III. A. 1 mutations affectant le gène Tau</i>	37
<i>III. A. 2 L'haplotype H1 comme facteur de susceptibilité</i>	38
III. B Dérégulation en <i>trans</i>	39
<i>III. B. 1 Modulation de l'activité des facteurs d'épissage par la phosphorylation</i>	39
<i>III. B. 2 Mutations affectant un facteur d'épissage</i>	40
<i>III. B. 3 Mutations induisant un changement de ratio des facteurs d'épissage</i>	41
CHAPITRE 3 - LA DYSTROPHIE MYOTONIQUE DE TYPE 1.....	44
I. GENERALITES	44
I. A. Génétique	44
I. B. Épidémiologie	45
I. C. Aspects cliniques	45
I. D. Traitements	46
II. EFFETS DE LA MUTATION ET MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES	46
II. A. Effets <i>cis</i>	47
<i>II. A. 1 Effet sur la transcription bidirectionnelle</i>	47

<i>II. A. 2 Effet sur la transcription du gène DMPK et des gènes voisins SIX5 et DMDW</i>	47
II. B Effets trans	48
<i>II.B.1 Le gain de fonction toxique des ARNs mutés et structure des triplets CUGs</i>	48
<i>II. B. 2 Effet trans sur l'expression des gènes</i>	51
<i>II.B.3 Effet trans sur l'épissage alternatif</i>	51
CHAPITRE 4 : LES FACTEURS D'ÉPISSAGE CELF ET MBNL : FONCTIONS NORMALES ET PATHOLOGIQUES DANS LA DM1	55
I. LES PROTEINES CELF	55
I. A CELF1	57
I. B CELF2	59
II. LES PROTEINES MBNL	59
II. A Des gènes aux transcrits	60
II. B Les protéines MBNL	61
<i>II. B. 1 Expression</i>	61
<i>II. B 2 Fonctions des protéines MBNL</i>	61
<i>II. B. 3 Structure et fonctions de MBNL1</i>	61
III. IMPLICATION DE MBNL1 DANS LA DM1	64
III. A Co-localisation de MBNL1 avec les expansions CUG	64
III. B Perte de fonction de MBNL1	65
OBJECTIFS	67
RESULTATS	73
I. IMPLICATION DU FACTEUR D'ÉPISSAGE MBNL1 DANS LA REGULATION DE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DES EXONS 2 ET 3 DE TAU DANS LA DM1	75
I. A Contexte de l'étude	75
I. B Objectifs de l'étude	75
I. C Résultats	76
II. ETUDE DE LA RELATION STRUCTURE/FONCTION DE MBNL1 : CONSEQUENCES DU CHANGEMENT D'ÉPISSAGE DE MBNL1 DANS LA DM1	89
II. A Contexte de l'étude	89
II. B Objectifs	89
II. C Résultats	90
III. LE DOMAINE DE LIAISON AUX ARNS DE MBNL1 : UN BON OUTIL POUR RESTAURER UN ÉPISSAGE NORMAL DE TAU DANS LA DM1 ?	109
III. A Contexte de l'étude	109
III. B Objectifs de l'étude	109
III. C Résultats	110
IV. CHANGEMENT D'ÉPISSAGE DE L'EXON 10 DE TAU DANS LA DM1	139
IV. A Contexte de l'étude	139
IV. B Objectifs de l'étude	139
IV. C Résultats	140
DISCUSSION	181
I. CHANGEMENT D'ÉPISSAGE DES EXONS 2, 3 ET 10 DE TAU DANS LA DM1	183

I. A Relation entre le changement d'épissage de Tau et la mutation DM1	183
I. B Le changement d'épissage dans la DM1 apparaît comme un épissage de type foetal	184
II. MECANISMES IMPLIQUES DANS LE CHANGEMENT D'EPISSAGE DES TRANSCRITS TAU...	184
II. A L'hypothèse de la réactivation d'un programme d'épissage de type foetal	184
II. B Rôles des protéines CELF	185
II. C Rôles des protéines <i>MBNL1</i>	186
II. C. 1 <i>Dérégulation de l'épissage alternatif de MBNL1 dans la DM1</i>	186
II. C. 2 <i>Perte de fonction de MBNL1 dans la DM1</i>	187
II. C. 3 <i>MBNL1 comme outil à visée thérapeutique ?</i>	187
III. CONSEQUENCES DU CHANGEMENT D'EPISSAGE DES TRANSCRITS TAU :	
DEVELOPEMENT DE LA PATHOLOGIE TAU ?	190
III. A La DM1 est une Tauopathie	190
III.B Relations entre la pathologie Tau et le changement d'épissage de Tau	191
CONCLUSION / PERSPECTIVES	195
BIBLIOGRAPHIE	197
ANNEXES	217
I. <i>Curriculum Vitae</i>	
II. Publications supplémentaires	
II. A Ghanem et al., 2009 Altered splicing of Tau in DM1 is different from the fetal process	
II. B Sergeant et al., 2001 Dysregulation of human brain microtubule associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1	

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique du gène <i>MAPT</i> , du transcrit primaire et des protéines isoformes de Tau dans le cerveau adulte.	19
Figure 2. Représentation schématique de la régulation de l'épissage alternatif des exons 2 et 10 de Tau.	21
Figure 3. Structure et fonctions des protéines Tau.	23
Figure 4. Tau et transport axonal.	26
Figure 5. Les protéines Tau pathologiques	30
Figure 6. La dégénérescence neurofibrillaire.	31
Figure 7. (A) Régions cérébrales et (B) distribution topographique de la DNF dans la MA	32
Figure 8. Organisation du cortex cérébral en six couches laminaires et distribution de la pathologie Tau.	33
Figure 9. Classification biochimique des Tauopathies.	35
Figure 10. Visualisation des inclusions ribonucléoprotéiques (<i>foci</i>)	46
Figure 11. Mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie de la DM1.	54
Figure 12. Structure des protéines CELF	56
Figure 13. Organisation du gène <i>MBNL1</i>	60
Figure 14. Structure primaire de l'isoforme MBNL1 incluant tous les exons alternatifs	62
Figure 15. Mécanisme d'action de MBNL1	63
Figure 16. Co-localisation de MBNL1 avec les expansions CUG	64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Séquences consensus essentielles à la réaction d'épissage	17
Tableau 2. Distribution et composition en exons des transcrits Tau	22
Tableau 3. Classification des tauopathies	36
Tableau 4. Modèles de souris transgéniques impliquant le rôle pathologique des répétitions CUG _{n>50}	50
Tableau 5. Liste des principaux transcrits dérégulés dans la DM1	53
Tableau 6. Nomenclature des protéines CELF	56
Tableau 7. Modèles de souris transgéniques impliquant le rôle pathologique de CELF1	58

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

APP : Amyloid Precursor Protein
CBD : Dégénérescence corticobasale
CELF : CUGBP and ETR-3 Like Factor
CIC-1: Canal chlore muscle spécifique de type 1
cTNT : Troponine T cardiaque
CUGBP: CUG Binding Protein
DM1 et 2 : Dystrophie Myotonique de type 1 et 2
DMPK : Dystrophia Myotonica Protein Kinase
DMWD : Dystrophia Myotonica-containing WD repeat motif
DNF: Dégénérescence Neurofibrillaire
ELAV: Embryonic Lethal Abnormal Vision
ETR-3: ELAV Type RNA binding protein 3
FTDP-17: Fronto-Temporal Dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17
IR: Récepteur à l'insuline
KO: Knock Out
MA: Maladie d'Alzheimer
MAP: Microtubule Associated Protein
MBNL1: Muscleblind Like 1
MSE: Muscle specific Enhancer
MTMR1: Myotubularin-Related 1
NMDA R1: N-méthyl-D-aspartate récepteur de type 1
PB : point de branchement
PSP : Paralyse Supranucléaire Progressive
PTB : Polypyrimidine Tract Binding protein
RRM : RNA Recognition Motif
SLA: Sclérose latérale amyotrophique
snRNA: Small nuclear ribonucleic acid
snRNP : Small nuclear ribo-nucleoprotein
TNNT3: Troponine T du muscle squelettique

AVANT PROPOS

« *An amazing sequence arrangement* »

En 1977, Richard Roberts et Phillip Allen Sharp introduisirent pour la première fois le terme d'épissage des ARN. Aujourd'hui, le développement des technologies de pointe révèle que plus de 90% du génome humain génère des transcrits soumis à un épissage alternatif (Pan, et al 2008 ; Wang et al, 2008). De nombreuses maladies génétiques sont liées à des mutations entraînant des dérégulations de l'épissage alternatif. De même, de plus en plus d'arguments vont en faveur d'une telle dérégulation dans le développement de maladies sporadiques.

Ici, nous nous intéressons à la pathologie Tau, lésion cérébrale observée dans plus d'une vingtaine de maladies neurodégénératives. La pathologie Tau correspond à des agrégats fibrillaires constitués de protéines Tau anormalement modifiées. Parmi les différentes hypothèses étiologiques, l'identification de mutations sur le gène *MAPT* codant la protéine Tau, entraînant un changement de son épissage, révèle qu'un changement d'épissage de Tau suffit à induire la pathologie. De plus, la caractérisation biochimique des agrégats révèle que selon la maladie, la composition en isoformes Tau est différente. En effet, alors que toutes les isoformes de Tau sont retrouvées agrégées dans la maladie d'Alzheimer, seule une principalement a été observée dans la dystrophie myotonique de type 1 (DM1). La DM1 est une maladie neuromusculaire, héréditaire à transmission autosomale dominante. L'anomalie génétique est localisée sur le gène *DMPK* et induit d'un point de vue moléculaire à une dérégulation de l'épissage alternatif de nombreux transcrits parmi lesquels Tau. Ainsi, la DM1 peut être considérée comme une « maladie modèle » pour étudier la relation entre changement d'épissage de Tau et le développement de la pathologie Tau. Afin de comprendre cette relation, il nous a semblé essentiel d'établir tout d'abord une relation entre le changement d'épissage de Tau et l'anomalie génétique DM1.

INTRODUCTION

Chapitre 1 - Tau : du gène à la protéine

Initialement identifiées par Weingarten et collaborateurs en 1975 comme essentielles à l'assemblage des dimères de tubuline (Weingarten et al., 1975), les protéines Tau appartiennent à la famille des protéines associées aux microtubules (MAP). Elles sont exprimées principalement dans les axones des neurones du système nerveux où elles ont pour fonction de favoriser et stabiliser la polymérisation/dépolymérisation des dimères de tubuline, constituants des microtubules.

Trente-cinq ans après leur découverte, les protéines Tau semblent être davantage que des protéines associées aux microtubules. Localisées également dans le noyau ou au niveau du bouton post-synaptique, les protéines Tau joueraient d'autres fonctions que celle d'association aux microtubules.

Après avoir décrit le gène et les transcrits générés par épissage alternatif, nous détaillerons les fonctions des différentes protéines isoformes.

I. LE GENE

I. A. La localisation chromosomique

Tau est codée par un gène unique (*MAPT*, MIM 157140) qui s'étend sur plus de 150kb (Neve et al., 1986). Il est localisé chez l'homme sur le bras long du chromosome 17 en position 17q21.31.

I. B La région promotrice du gène *MAPT*

La transcription d'un gène est sous contrôle d'un promoteur qui, succinctement, est constitué de séquences *cis* régulatrices sur lesquelles des facteurs de transcription viennent se fixer. Le promoteur putatif de Tau ne contient pas les séquences *cis* régulatrices TATA ni CAAT, motifs couramment retrouvés dans les régions promotrices des gènes eucaryotes. Cependant, la présence d'éléments de réponse des facteurs de transcription SP1 et AP2 a été mise en évidence (Andreadis et al., 1996). Ces derniers semblent impliqués dans la régulation de l'expression neurone-spécifique de Tau (Heicklen-Klein and Ginzburg, 2000; Sadot et al., 1996).

La séquence du gène *MAPT* contient deux régions riches en nucléotides C et G appelées îlots CG ou CpG. L'un est localisé en amont de l'exon -1, et fait partie du promoteur putatif de Tau et l'autre dans l'exon 9 (Andreadis et al., 1996). Les îlots CpG représentent 1% du génome humain et sont caractéristiques des « gènes de ménages » (*house-keeping genes*). Ces îlots CpG peuvent être méthylés (on parle de modification épigénétique), ce qui a pour conséquence d'inhiber la transcription du gène. Chez les personnes âgées, une augmentation de la méthylation de ces sites a été observée suggérant une potentielle dérégulation de la transcription du gène *MAPT* avec l'âge (Tohgi et al., 1999).

Les protéines Tau sont exprimées principalement dans le cerveau mais ont également été décrites dans d'autres tissus tels que le muscle (Andreadis et al., 1996). Les mécanismes de régulation impliqués dans l'expression de Tau dans les tissus musculaires demeurent encore complètement inconnus. En revanche, l'expression neurone-spécifique de Tau a été confirmée par une étude: dans un modèle de souris transgénique où il a été observé que l'expression de la protéine recombinase CRE sous le contrôle du promoteur Tau murin était uniquement neuronale (Muramatsu et al., 2008).

I. C. Le polymorphisme du gène *MAPT*

Le gène *MAPT* présente plusieurs variations génétiques ou polymorphismes dans sa séquence nucléotidique. L'ensemble de ces variations génétiques, en déséquilibre de liaison (c'est-à-dire faiblement éloignées les unes des autres et donc transmises conjointement à la génération suivante) correspond à un haplotype. Dans la population totale, il existe deux haplotypes du gène *MAPT*: l'haplotype H1 et l'haplotype H2 qui correspondent à des polymorphismes qui s'étendent de l'exon -1 à l'exon 13 sur le gène *MAPT*. L'haplotype H1 est retrouvé avec une fréquence variable comprise entre 70% et 98% selon les populations étudiées. L'haplotype H2 est plus rare. Il est retrouvé essentiellement dans les populations européennes caucasiennes à une fréquence d'environ 30% et est très rare dans d'autres populations comme par exemple chez les japonais (1,5%) (Evans et al., 2004). Les variations génétiques présentes sur l'haplotype H1 et non H2 peuvent influencer la transcription du gène *MAPT* et l'épissage alternatif de son transcrite primaire (Caffrey et al., 2006; Caffrey and Wade-Martins, 2007; Kwok et al., 2004; Myers et al., 2007).

II. LES TRANSCRITS

II. A Généralités sur l'épissage alternatif

II. A. 1 L'épissage de l'ARN pré-messager

Le gène *MAPT* est transcrit en ARN pré-messager (transcrit primaire). L'ARN pré-messager subit un ensemble de modifications post-transcriptionnelles parmi lesquelles l'épissage du transcrit primaire, l'ajout de la coiffe à l'extrémité 5' et la polyadénylation à l'extrémité 3'. Il en résulte un ARN messager ou transcrit mature qui sera exporté dans le cytoplasme où il sera traduit en protéine.

L'épissage correspond à l'excision/élimination des séquences non codantes (introns) puis épissage (raboutage) des séquences codantes (exons). Le transcrit mature est donc composé des séquences exoniques uniquement.

La base de la réaction d'épissage repose sur la reconnaissance de motifs consensus localisés sur l'ARN pré-messager par les petits ARNs nucléaires du complexe d'épissage (Tableau 1). Le complexe d'épissage ou splicéosome est un complexe macromoléculaire composé de 5 petits ARNs nucléaires (ARNsn pour Small nuclear RNA) riches en U (U1, U2, U4, U5 et U6) associés à de nombreuses protéines dont la fonction est de catalyser la réaction d'épissage.

Eléments cis	Séquence consensus
site d'épissage 5' ou site donneur	YRG/ <u>GURAGU</u>
le point de branchement, situé à environ 30 nucléotides du site d'épissage 3'	YNYUR <u>AY</u>
site d'épissage 3' ou site accepteur précédé de la région poly-pyrimidine	Y ₁₂ NY <u>AG</u> /

Tableau 1 : Séquences consensus essentielles à la réaction d'épissage. Symboles utilisés : Y=Pyrimidine ; R=Purine ; N= n'importe quel nucléotide ; Slash (/) = jonction intron/exon ; nucléotides soulignés sont invariants

II. A. 2 Mécanisme et régulation de l'épissage alternatif

La plupart des exons sont **constitutifs**, c'est à dire toujours inclus dans l'ARN messager mature. D'autres sont inclus ou exclus, et sont appelés **exons alternatifs** ou exons cassettes, on parle alors d'épissage alternatif.

L'épissage alternatif des ARNs pré-messagers est un mécanisme biologique complexe par lequel différentes combinaisons d'exons sont inclus dans l'ARN messager mature générant ainsi plusieurs transcrits matures à partir d'un ARN pré-messager. L'exemple le plus spectaculaire concerne le gène *Dscam* (*Down syndrome cell adhesion molecule gene*) chez *Drosophila melanogaster* qui suite à l'épissage alternatif de son ARN pré-messager peut générer 38016 ARN messagers matures différents. Chez l'Homme, aujourd'hui, on estime que plus de 90% des transcrits primaires génèrent plusieurs transcrits matures après épissage alternatif (Pan et al., 2008; Wang et al., 2008a).

Le profil d'épissage d'un exon alternatif est régulé selon le stade de développement et selon le type de tissu. Deux éléments essentiels interviennent dans la régulation de l'épissage alternatif : des éléments *cis* et *trans* régulateurs.

Les éléments *cis* régulateurs correspondent à des motifs consensus présents sur l'ARN pré-messager. Ces motifs forment des sites putatifs de liaison à des facteurs *trans* régulateurs. L'expression et l'activité de ces facteurs *trans* varient selon le stade du développement et diffèrent d'un tissu à l'autre. La liaison de ces facteurs à leurs séquences respectives facilite ou au contraire inhibe la reconnaissance des sites d'épissage et/ou le recrutement/assemblage du complexe d'épissage.

II. B Epissage alternatif de Tau dans le cerveau

Le transcrit primaire de Tau est composé de 16 exons dont 14 sont codants (Figure 1) (Andreadis et al., 1992). L'exon -1 fait partie du promoteur et de la région 5'UTR (région 5' non traduite). L'exon 14 fait partie de la région 3' non traduite (3' UTR) (Andreadis et al., 1992; Goedert et al., 1989a). Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont constitutifs. Les exons 2, 3, 4a, 6, 8 et 10 sont alternatifs. L'épissage de ces exons alternatifs est régulé de façon tissu-spécifique et selon le stade de développement (Andreadis, 2005).

Dans le système nerveux central (SNC), les exons 4a et 8 sont systématiquement exclus, l'exon 6 est minoritaire et les exons 2, 3 et 10 sont alternatifs. Leur épissage est régulé selon le stade de développement et selon le type de population neuronale (Goedert et al., 1989b).

Ainsi, dans le cerveau fœtal, seule l'isoforme la plus courte, excluant les exons 2, 3 et 10 est exprimée. En revanche, dans le cerveau adulte, l'épissage alternatif de ces 3 exons génère une combinaison de 6 transcrits matures (2-3-10- ; 2-3-10+ ; 2+3-10- ; 2+3-10+ ; 2+3+10- ; 2+3+10+) (Figure 1). De plus, il a été observé par hybridation *in situ* que l'isoforme incluant l'exon 10 était exprimée dans les neurones pyramidaux et non granulaires de la formation hippocampique

alors que l'isoforme excluant l'exon 10 était exprimée dans ces deux types de populations neuronales (Goedert et al., 1989a).

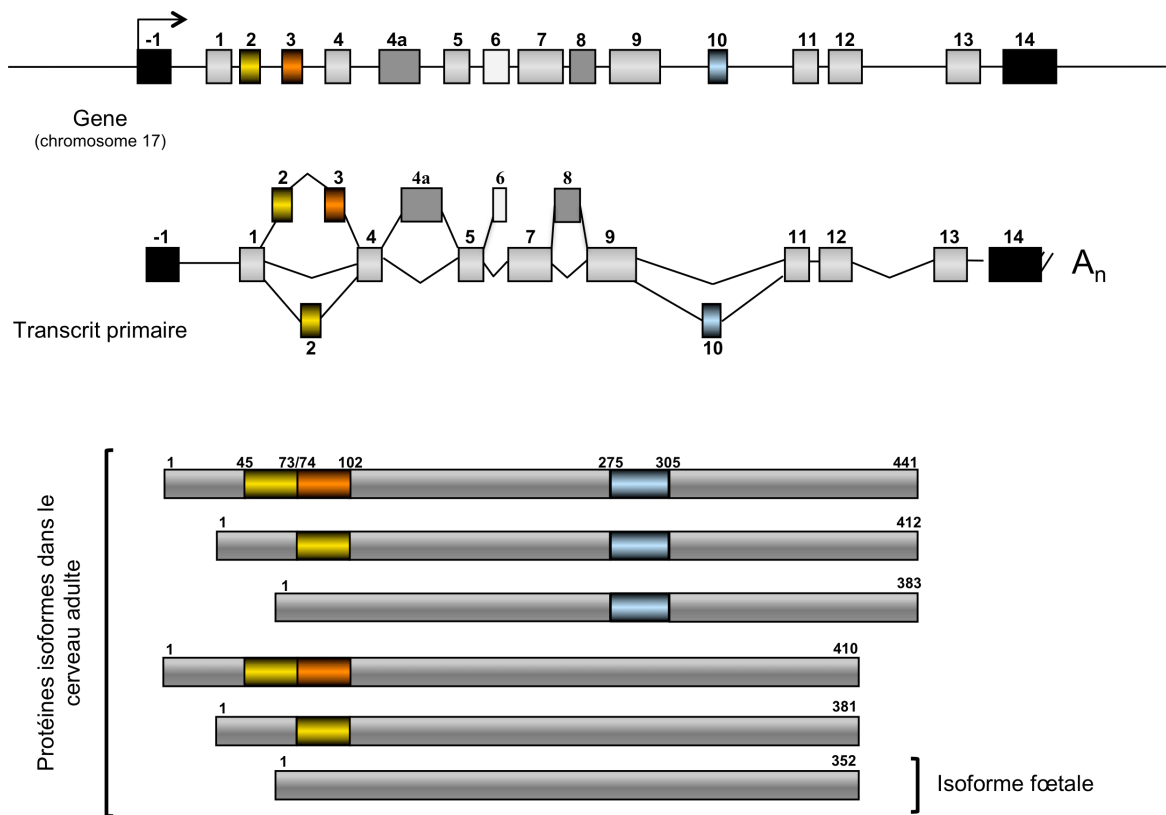


Figure 1. Représentation schématique du gène *MAPT*, du transcrit primaire et des protéines isoformes de Tau dans le cerveau adulte. Le gène Tau est localisé sur le chromosome 17 et contient 16 exons dont 14 sont codants. Les exons 2, 3, 4a, 6, 8 et 10 sont alternatifs. Dans le cerveau adulte, seuls les exons 2, 3 et 10 sont exprimés. D'après (Sergeant et al., 2008).

II. B. 1. Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 2

L'exon 2 de Tau est alternatif dans le cerveau adulte (Goedert et al., 1989b; Himmler et al., 1989; Kosik et al., 1989), et constitutif dans le muscle squelettique (Castle et al., 2008; Wei and Andreadis, 1998). Dans le cortex adulte, le cervelet et l'hippocampe, les isoformes incluant l'exon 2 représentent la moitié des isoformes Tau.

Plusieurs séquences *cis* régulatrices ont été identifiées pour l'exon 2 (Figure 2A). Une séquence riche en purine correspondant à un élément activateur a été identifiée dans la séquence exonique. Elle permet la fixation des facteurs *trans*-régulateurs SLM2 et Nova1 (Li et al., 2003). Les autres séquences exoniques identifiées correspondent à des éléments répresseurs. L'un d'entre eux est situé dans les 20 premiers nucléotides de l'exon 2. Il lie le complexe protéique SRp30/SRp55/htra2 β 1 (Wang et al., 2005), qui par encombrement stérique, inhibe la fixation du complexe d'épissage, réprimant ainsi l'inclusion de l'exon 2. Deux

éléments répresseurs introniques situés dans l'intron 1 en 3' de l'exon 2 ont été identifiés (Figure 2A). Le premier possède des motifs de fixation au facteur d'épissage PTB, caractérisé comme facteur répresseur de l'inclusion de l'exon 2 (Li et al., 2003). Cependant, au sein de cette même séquence, des motifs de liaisons aux facteurs nPTB, Nova1 et CELF4 auraient également été identifiés. La fixation de l'un de ces facteurs sur cette séquence *cis*-régulatrice empêcherait celle de PTB par encombrement stérique (Figure 2A). Le deuxième élément répresseur intronique identifié est localisé dans l'intron en 5' de l'exon 2 entre les nucléotides -571 et -281 bien qu'aucun facteur *trans*-régulateur capable de s'y lier n'ait pu encore être identifié (Li et al., 2003). Enfin, plus récemment, le laboratoire a mis en évidence le rôle du facteur d'épissage ETR-3 comme répresseur fort de l'inclusion de l'exon 2 de Tau (Leroy et al., 2006a).

II. B. 2 Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 3

Tout comme l'exon 2, l'exon 3 n'est pas exprimé chez le fœtus. Chez l'adulte, il est faiblement inclus dans le SNC, alors qu'il est constitutif dans le SNP et le muscle (Andreadis, 2005).

L'inclusion de l'exon 3 dépend de celle de l'exon 2. Ainsi, l'exon 3 n'est jamais présent sans l'exon 2, mais l'inclusion de l'exon 2 n'induit pas forcément celle de l'exon 3, bien que ce dernier ait un effet activateur (Andreadis et al., 1995). Une séquence *cis*-activatrice localisée en 3' de l'exon 3, dans une région riche en purines fixerait potentiellement les facteurs *trans* SRp55, et SRp75 et SLM2 (Arikan et al., 2002). Deux séquences *cis*-inhibitrices ont été identifiées dans l'exon 3 dont l'une correspondrait au motif consensus TTAG (Andreadis, 2005; Arikan et al., 2002). Le facteur *trans*-régulateur s'y fixant est inconnu, cependant une mutation ponctuelle de cette séquence entraînerait une inclusion quasi totale de l'exon 3 (Arikan et al., 2002). Plusieurs facteurs *trans*-régulateur réprimant l'inclusion de l'exon 3 ont été identifiés parmi lesquels htra2 β 1, hnRNP A1, SWAP, Nova1, KSRP (Andreadis, 2005; Arikan et al., 2002).

II. B. 3 Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 10

Comme les exons 2 et 3, l'exon 10 n'est pas exprimé chez le fœtus. Dans le SNC adulte, l'exon 10 est alternatif et inclus dans environ 50% des transcrits. En revanche dans le SNP, l'exon 10 est constitutivement inclus (Andreadis, 2005; Couchie et al., 1992; Goedert et al., 1992; Goedert et al., 1989b; LeProust et al., 2000).

Plusieurs séquences exoniques régulatrices ont été mises en évidence : à l'extrémité 5' de l'exon 10 se situent 3 séquences *cis* activatrices : une de type SC35-like, une riche en purines (Polypurine Enhancer, PPE) et enfin, une riche en A et C (ACE riche enhancer) (Figure 2B). A

proximité de cette région a été localisée une séquence *cis*-répresseur suivie par une dernière séquence *cis*-activatrice à l'extrémité 3' de l'exon. Dans la région intronique, un élément régulateur bipartite composé d'un répresseur et d'un modulateur a été caractérisé. L'élément modulateur n'a pas d'effet en lui-même, mais agit en contrebalançant l'effet du répresseur (Andreadis, 2005).

Plusieurs facteurs *trans*-régulateurs de l'épissage alternatif de l'exon 10 ont été caractérisés (Figure 2B) parmi lesquels ASF, SC35, SRp30c, htra2β1 et CELF3 et 4 agissent comme activateurs ; alors que SRp20, 9G8, SRp54, SRp55, SRp75, PTB, hnRNP G, SWAP, KSRP et Nova1 auraient davantage un effet répresseur (Andreadis, 2005; Liu and Gong, 2008).

Un deuxième niveau de régulation en *cis* intervient dans la régulation de l'épissage de l'exon 10. En effet, la séquence nucléotidique de l'exon 10 et de ses introns flanquants forme une structure secondaire de type tige / boucle réprimant l'inclusion de l'exon 10 en inhibant la liaison de U1 snRNP (Grover et al., 1999).

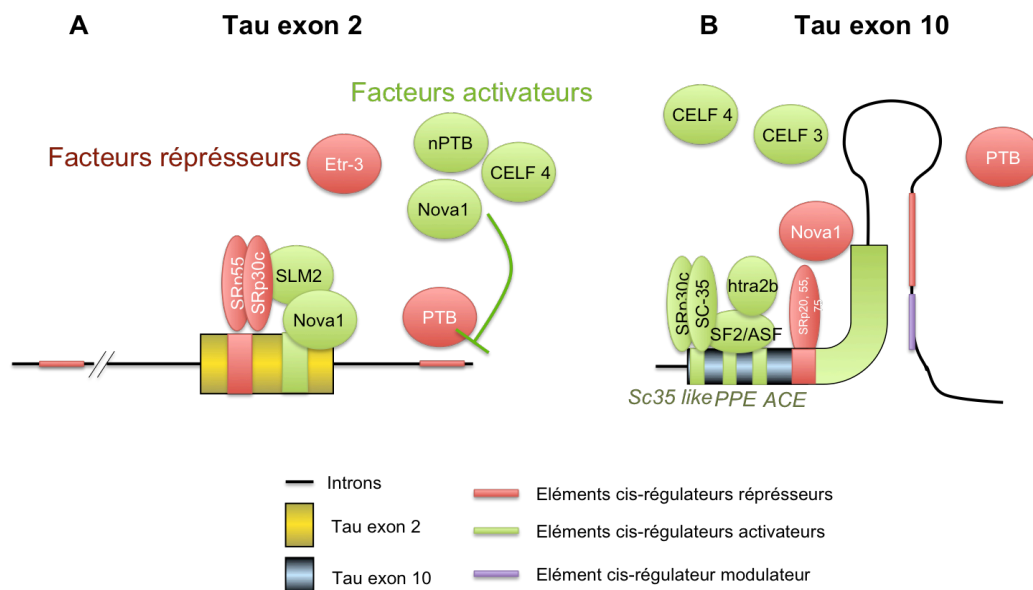


Figure 2. Représentation schématique de la régulation de l'épissage alternatif des exons 2 et 10 de Tau. (A). Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 2. L'exon 2 de Tau est représenté en jaune. Il inclut des éléments régulateurs activateurs (vert) et répresseurs (jaune). Les facteurs *trans* activateurs (vert) et répresseurs (rouge) viennent se fixer sur ces séquences *cis* comme indiqué sur le schéma. (B). Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 10. L'exon 10 de Tau est représenté en bleu, les séquences régulatrices exoniques en rouge (répresseur) ou vert (activateur). La structure secondaire de type tige boucle qu'adopte l'exon 10 de Tau ainsi que son intron ajoute un deuxième niveau de régulation. Schémas adaptés de (Li et al., 2003; Liu and Gong, 2008; Wang et al., 2005)

II. C Polyadénylation des transcrits

Avant d'être exporté dans le cytoplasme, les ARN pré-messagers subissent des modifications post-transcriptionnelles à leurs extrémités 5' et 3'. L'extrémité 5' subit des modifications chimiques qui aboutissent à la formation d'une « coiffe » qui va stabiliser l'ARN messenger, faciliter son export et l'initiation de sa traduction. L'extrémité 3' subit une polyadénylation qui correspond à l'ajout d'une queue poly A. Il existe deux sites de polyadénylation distants d'environ 4kb sur le transcrit Tau (Sadot et al., 1994). L'utilisation alternative de ces deux sites induit la formation de deux régions 3'UTR (*untranslated région*) différentes qui contrôlent la stabilité et la localisation de l'ARNm de Tau (Behar et al., 1995). Il en résulte deux transcrits de 2 et 6kb. Le transcrit de 2kb coderait pour les protéines Tau nucléaires (Thurston et al., 1997; Wang et al., 1993) alors que celui de 6kb code pour les Tau axonales (Couchie et al., 1988; Goedert et al., 1989a; Takemura et al.). Un troisième transcrit a été identifié uniquement dans le SNP : le transcrit de 9kb (Couchie et al., 1992; Nunez and Fischer, 1997), qui se distingue des transcrits de 2 et 6 kb par la présence de l'exon 4a (Goedert et al., 1992)(Tableau 2).

Transcrits (kb)	localisation subcellulaire	Tissu	exons alternatifs	Références
2	nucléaire principalement	SNC et SNP	2, 3, 10 régulés	(Thurston et al., 1997; Wang et al., 1993)
6	axonale principalement	SNC principalement	2, 3, 6, 10 régulés	(Couchie,et al., 1988 ; Goedert, et al., 1989)
9	axonale principalement	SNP et rétine	2, 3, 10 et 4a constitutifs 6 régulé	(Couchie et al., 1992; Goedert et al., 1992; Nunez and Fischer, 1997)

Tableau 2. Distribution et composition en exons des transcrits Tau. Les transcrits de 2 et 6kb se distinguent par leurs sites de polyadénylation distants de 4kb et sont exprimés dans le système nerveux central (SNC) principalement. Le transcrit de 9kb, exprimé uniquement dans le système nerveux périphérique (SNP) diffère des transcrits de 2 et 6kb par la présence de l'exon 4a. Les exons 2, 3 et 10 sont spécifiques des Tau du cerveau adulte. L'exon 4a est spécifique des Tau du système nerveux périphérique (Couchie et al., 1992; Goedert et al., 1992; Nunez and Fischer, 1997). L'exon 6 est minoritaire, à peine présent dans le cerveau, il est davantage exprimé dans d'autres tissus tels que la moelle épinière et le muscle (Georgieff et al., 1993; Luo et al., 2004). L'exon 8 n'est inclus que dans le muscle, la moelle épinière et l'hypophyse (Castle et al., 2008).

III. LES PROTEINES TAU

III. A Structure des protéines Tau

D'un point de vue général, les protéines Tau sont solubles, thermostables et ne présentent pas de conformation structurée (Lee et al., 1988; Schweers et al., 1994).

La traduction des transcrits en protéines Tau commence à l'exon 1. Dans le cerveau adulte, en fonction du transcrit, l'isoforme exprimée contient entre 352 et 441 acides aminés et a une masse moléculaire apparente comprise entre 45 et 65 kDa en gel SDS-PAGE (Buee et al., 2000). Les isoformes de Tau diffèrent les unes des autres par l'absence (0N) ou la présence d'un (1N) ou deux inserts (2N) de 29 acides aminés dans la région amino-terminale et par la présence de trois (3R) ou quatre (4R) motifs répétés de liaison aux microtubules du côté carboxy-terminal. Les inserts 1N ou 2N correspondent aux séquences codées par les exons 2 ou les exons 2 et 3. Le quatrième motif répété de liaison aux microtubules est codé par l'exon 10. Il correspond au deuxième motif (R2) qui s'intercale entre les motifs R1 et R3 (Figure 3).

La structure primaire de Tau se subdivise en deux régions : la région amino-terminale incluant une région riche en résidus proline juxtaposant le premier motif répété de liaison aux microtubules et la région carboxy-terminale qui inclue les motifs répétés de liaisons aux microtubules (Figures 1 et 3). La région amino-terminale (à l'exclusion de la région riche en résidus proline) est plus ou moins acide et chargée négativement selon la présence des inserts peptidiques (1N ou 2N). Cette région est également appelée domaine de projection car elle se « projette » depuis les microtubules vers l'extérieur de ces derniers. La région riche en résidus proline avec la région carboxy-terminale est davantage basique. Cette dernière incluant les motifs de liaisons aux microtubules est appelée domaine de liaison aux microtubules (Figure 3).

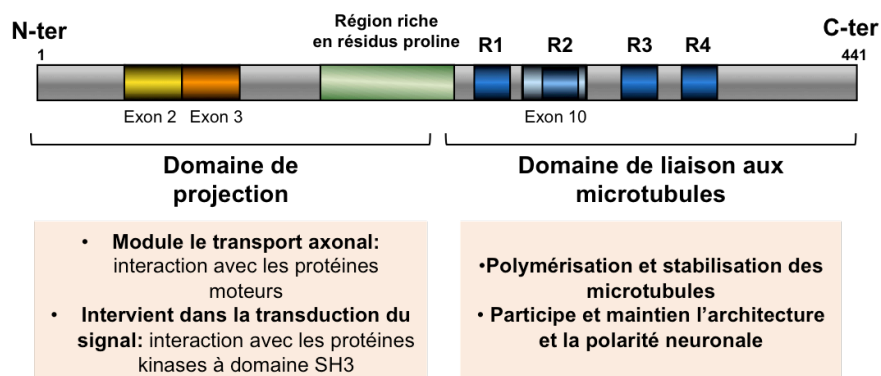


Figure 3. Structure et fonctions des protéines Tau. Tau peut être divisée en deux régions, le domaine amino-terminal appelé domaine de projection impliqué dans les interactions avec les autres éléments cellulaires et dans le transport axonal ; et le domaine carboxy-terminal appelé domaine de liaison aux microtubules impliqué dans la polymérisation et la stabilisation du réseau microtubulaire et jouant donc un rôle important dans l'architecture et le maintien de la polarité neuronale. Le domaine de liaison aux microtubules contient 3 (R1, R3 et R4) ou 4 motifs répétés selon l'inclusion ou pas de l'exon 10 (R1, R2, R3 et R4).

III. B Fonctions principales de Tau et modulation par l'épissage alternatif

Les protéines Tau sont exprimées principalement dans les axones des neurones. Cependant, Tau est également localisé au niveau des membranes plasmiques, au niveau du bouton post-synaptique (dendrites) et dans le noyau. Selon sa localisation subcellulaire, Tau exercerait différentes fonctions. Ces dernières sont également modulées selon les différentes isoformes de Tau.

III. B. 1 Fonctions associées au domaine de liaison aux microtubules

III. B. 1. a Polymérisation et stabilisation des microtubules

Les microtubules sont des constituants du cytosquelette au même titre que les filaments d'actine et les filaments intermédiaires. Ce sont des structures dynamiquement instables dont la formation repose sur l'association d'hétérodimères de tubuline (a et b) en protofilaments. Ces 13 protofilaments s'associent entre eux et forment des structures cylindriques de 25 nm de diamètre : les microtubules. Dans le cerveau, les microtubules constituent la charpente des neurones, ils sont présents minoritairement dans les dendrites et principalement dans les axones où ils s'arrangent en un réseau microtubulaire, essentiel au transport axonal.

Tau se lie aux dimères de tubuline via son domaine de liaison aux microtubules incluant 3 ou 4 motifs répétés (3R, 4R). La présence du deuxième motif R2 (inclusion de l'exon 10) confère aux isoformes 4R une affinité de liaison aux microtubules 40 fois supérieure à celle des isoformes 3R (Goode and Feinstein, 1994). *Via* sa liaison aux microtubules, Tau favorise la polymérisation des dimères de tubuline et stabilise le réseau microtubulaire (Drechsel et al., 1992). Les isoformes 4R qui contiennent un motif de plus que les isoformes 3R accéléreraient davantage la vitesse de polymérisation des dimères de tubulines (Goedert et al., 1989a). Aucune influence du domaine de projection incluant ou pas les inserts n'a pu être observée, que cela soit par rapport aux fonctions de liaison et/ou polymérisation des microtubules (Goedert et al., 1989a). En revanche, la présence des inserts N-terminaux modulerait l'espace entre les faisceaux de microtubules et participerait donc à la taille du diamètre axonal (Chen et al., 1992). Il en est de même pour l'exon 4a, exprimé dans le SNP uniquement, ce qui expliquerait le diamètre plus important des fibres axonales périphériques.

Cette différence fonctionnelle entre isoformes est d'un grand intérêt. En effet, au cours du développement, une fois la migration neuronale et la croissance du cône axonal achevées, les neurones s'engagent dans la formation des synapses. Il est essentiel, à ce moment là, que le

réseau microtubulaire soit stabilisé et que la plasticité du cytosquelette soit moindre. Un des mécanismes mis en jeu serait un changement de ratio d'isoforme 3R/4R où les 3R diminueraient progressivement au profit des isoformes 4R, plus aptes à stabiliser les microtubules (Goode and Feinstein, 1994; Kosik et al., 1989).

III. B. 1. b polarité neuronale

Les microtubules sont des structures orientées et extrêmement instables : chaque protofilament comporte une extrémité (+) et une extrémité (-) correspondant aux lieux de polymérisation et de dépolymérisation, respectivement. La stabilisation de ces extrémités par les protéines Tau, est essentielle et participe au maintien de la polarité neuronale (Caceres and Kosik, 1990). Les neurones présentent un compartiment somato-dendritique et un prolongement axonal terminé par un bouton synaptique. De par sa fonction de liaison aux microtubules, Tau participe au maintien de cette polarité neuronale. Tau est plus faiblement exprimée dans les dendrites que dans les axones des neurones où sa concentration croît depuis la région proximale (à proximité du soma) à la région distale (à proximité du bouton synaptique) (Dotti et al., 1987). Ce gradient de concentration permet de stabiliser le réseau microtubulaire et de maintenir la structure axonale (Caceres and Kosik, 1990).

III. B. 2 Fonctions associées au compartiment axonal : régulation du transport axonal

Le neurone est une cellule polarisée dont les extrémités sont éloignées l'une de l'autre. Aussi, l'existence d'un transport axonal bidirectionnel est essentielle pour le bon fonctionnement du neurone. Ce transport axonal est assuré par des « rails » que forment les microtubules et des protéines « moteur » : les kinésines et le complexe dynéine/dynactine. Alors que les kinésines assurent le transport antérograde (du corps cellulaire vers la synapse), le complexe dynéine/dynactine achemine les vésicules de transport/organites de façon rétrograde (de la synapse vers le corps cellulaire).

Tau (1) maintient la structure et la stabilité des rails en assurant la polymérisation et la stabilisation du réseau microtubulaire et (2) module l'activité des protéines « moteur » en interagissant avec elles.

En interagissant avec la kinésine 1 (Cuchillo-Ibanez et al., 2008; Utton et al., 2005), Tau modulerait la fréquence d'attachement de la kinésine 1 aux microtubules (Trinczek et al., 1999). Tau n'influence pas la vitesse du transport axonal assuré par la kinésine mais inhibe son

recrutement aux microtubules. Cet effet serait dépendant du domaine de liaison aux microtubules de Tau et régulé par le caractère plus ou moins acide de son domaine de projection (Dixit et al., 2008). Le domaine de projection de Tau est acide, il mimerait les dimères de tubuline (également acides) et renforcerait l'interaction entre Tau et la kinésine (Dixit et al., 2008). L'effet de Tau sur le transport axonal antérograde, pourrait être isoforme-dépendant comme nous venons de le voir (Dixit et al., 2008; Stoothoff et al., 2008) et aussi dose-dépendant (Dixit et al., 2008; Ebner et al., 1998; Vershinin et al., 2007). Ainsi, comme l'expression de Tau est plus concentrée dans la région distale que proximale de l'axone, la kinésine 1 se lie plus efficacement aux microtubules dans la région proximale que distale de l'axone. Elle initie ainsi le transport antérograde de protéines cargo qui seront relarguées dans la région distale de l'axone (Figure 4).

De même, Tau interagit également avec le complexe dynéine/dynactine (Magnani et al., 2007). Or contrairement à l'interaction entre Tau et la kinésine 1, celle entre Tau et le complexe dynéine/dynactine ne modulerait pas l'affinité du complexe moteur pour le réseau microtubulaire (Dixit et al., 2008).

Tau jouerait donc un rôle essentiel dans la régulation du transport axonal et plus particulièrement le transport antérograde en agissant sur le réseau microtubulaire et en modulant l'activité des protéines « moteur » de façon dose-dépendante et isoforme-dépendante (Figure 4).

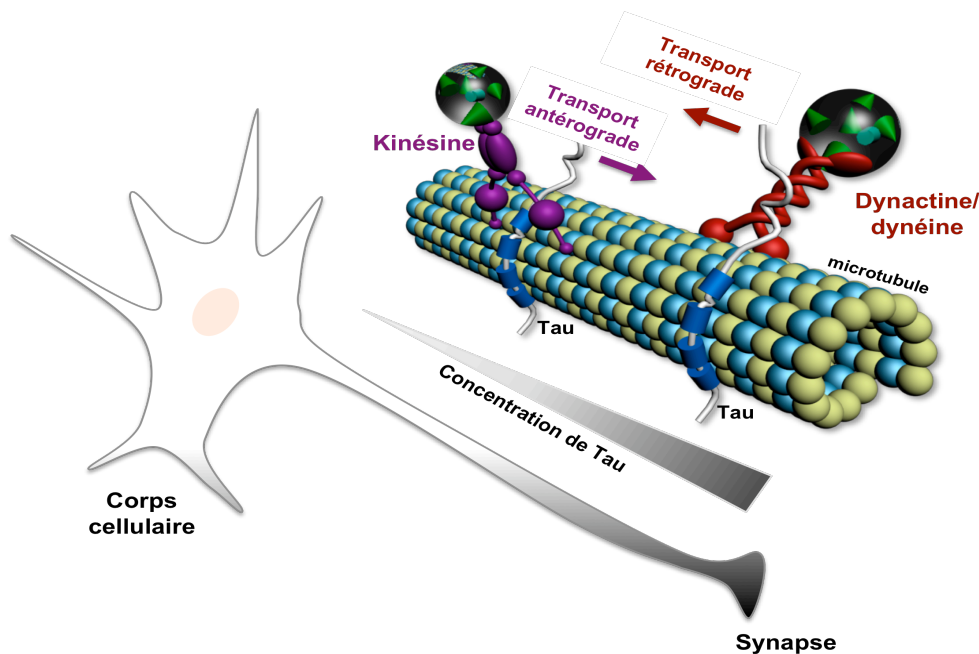


Figure 4. Tau et transport axonal. Tau régule le transport axonal en (1) stabilisant le réseau microtubulaire et (2) en modulant l'activité des protéines moteur kinésine 1 et dynéine/dynactine. Tau est plus concentrée dans la région distale que proximale de l'axone. La kinésine va se lier efficacement aux microtubules dans la région proximale de l'axone et initier le transport antérograde des vésicules de transport. Ces vésicules vont être relarguées avec la kinésine dans la région distale de l'axone où la concentration croissante de Tau inhibe l'interaction kinésine/microtubules.

III. B. 3 Fonctions associées à la localisation de Tau à la membrane plasmique

Tau peut être localisée à la membrane plasmique via son domaine de projection (Brandt et al., 1995). De plus, la surexpression du domaine de projection seul dans des cellules PC12 induites au NGF inhibe la différenciation neuronale et donc la croissance neuritique (Brandt et al., 1995). Ces résultats suggèrent que Tau peut interagir avec des protéines membranaires, ou associées à la membrane plasmique, impliquées dans les voies de signalisation induites par le NGF. En accord avec cette idée, il a été montré que Tau interagissait via sa région riche en résidus proline (motifs PXXP) avec le domaine SH3 de plusieurs tyrosines kinases dont c-Abl, la sous unité p85 de la phosphatidylinositol-3-kinase, la phospholipase C gamma, la protéine 14-3-3 et Grb2 (Derkinderen et al., 2005; Reynolds et al., 2008; Yuan et al., 2004).

Tau semble donc être bien plus qu'une protéine associée aux microtubules *via* ses interactions lui conférant potentiellement un rôle dans des voies de **transduction du signal** impliquées dans la modulation du réseau microtubulaire et celle du cytosquelette d'actine et dans la croissance neuritique (Lee et al., 2005; Sharma, 2007).

Fonctions associées à la localisation de Tau au bouton post-synaptique

Tau interagit également avec le domaine SH3 des tyrosines kinases de la famille src telles que Fyn (Lee et al., 1998). Fyn est une tyrosine kinase principalement localisée au niveau des membranes plasmiques et est impliquée dans la transmission de l'influx nerveux via la voie glutamatergique. L'interaction Tau-Fyn implique donc Tau dans des voies de transduction du signal activées par des signaux extracellulaires, suggérant que ces derniers peuvent influencer la distribution spatiale du réseau microtubulaire.

Plus récemment, le contraire fut envisagé. En effet, dans certaines conditions pathologiques, Tau est anormalement relocalisée dans la région somato-dendritique du neurone (Ballatore et al., 2007). Cette distribution anormale de Tau semblerait entraîner celle de Fyn également. La localisation plus importante de Fyn au niveau des dendrites rendrait la cellule anormalement plus sensible aux signaux extracellulaires d'origine post-synaptique (Ittner et al., 2010).

L'affinité entre Tau et Fyn est modulée par le degré d'acidité de Tau. En effet, moins Tau est acide, plus l'interaction est forte (Lee et al., 1998). Deux phénomènes peuvent moduler le degré d'acidité de Tau : la phosphorylation, qui constitue la modification post-traductionnelle majeure de Tau et l'épissage alternatif. La phosphorylation donne à Tau un caractère acide et les auteurs observèrent une interaction plus faible de Tau phosphorylée avec Fyn (Lee et al., 1998). Bien que les auteurs n'aient pas testé différentes isoformes, on peut supposer que les isoformes

incluant l'exon 2 ou les exons 2 et 3 interagissent également moins bien avec Fyn dû à l'augmentation de l'acidité du domaine amino-terminal de Tau. De plus, l'inclusion de l'exon 2 semblerait également favoriser la phosphorylation de Tau (Greenwood et al., 1994), ce qui renforce l'hypothèse que les fonctions de Tau sont également modulables selon les isoformes considérées.

III. B. 4 Fonctions associées à la localisation de Tau au noyau

Des études menées dans des lignées cellulaires de type neuronal ont révélé la présence des protéines Tau dans le compartiment nucléaire (Loomis et al., 1990). Localisée au niveau du nucléole, sous-compartiment nucléaire où siège la transcription des ARN ribosomiques, Tau pourrait participer à l'organisation du nucléole (Sjoberg et al., 2006).

Une autre fonction putative de Tau dans le noyau serait liée à sa capacité à se fixer à des motifs d'ADN double-brin riches en AT (adénine et thymine) de l'ADN satellite de l'hétérochromatine constitutive (Hua et al., 2003; Sjoberg et al., 2006). Cette liaison Tau-ADN semblerait conférer à Tau un rôle protecteur de l'ADN contre le stress thermique (Hua and He, 2003). Ces données sont confirmées par des études plus récentes effectuées au sein du laboratoire. Ces données obtenues à partir de cultures primaires de neurones suggèrent qu'en conditions de stress thermique, la protéine Tau cytosolique subirait une déphosphorylation et une translocation nucléaire. Une fois localisée dans le compartiment nucléaire, Tau se lierait à l'ADN. La liaison de Tau à l'ADN le protégerait des altérations induites par le stress cellulaire (Sultan et al., 2010), conférant ainsi à Tau un rôle neuroprotecteur en conditions de stress thermique.

III. C Modifications post-traductionnelles : phosphorylation de Tau

Tau est une phospho-protéine (Butler and Shelanski, 1986). Il existe 85 sites potentiels de phosphorylation (sérine, thréonine et tyrosine) sur l'isoforme la plus longue de Tau dont plus de 45 ont déjà été décrits comme étant phosphorylés (Buee et al., 2000; Hanger et al., 2009). La plupart de ces sites sont situés à proximité du domaine riche en proline et dans le domaine de liaison aux microtubules, à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine (Hanger et al., 2009; Sergeant et al., 2008).

La phosphorylation reste avant tout un phénomène physiologique. C'est une modification post-traductionnelle majeure des protéines Tau qui est régulée selon le stade de développement et qui peut également être modulée suivant les isoformes de Tau (Greenwood et al., 1994). Elle permet de réguler la liaison de Tau aux microtubules (Lindwall and Cole, 1984) et assure ainsi

l'équilibre de la dynamique microtubulaire. En effet, le domaine riche en proline ainsi que le domaine de liaison aux microtubules sont des régions basiques ce qui favorise l'interaction de Tau avec la tubuline qui est acide. La phosphorylation permet de neutraliser le caractère basique de Tau et donc d'inhiber la liaison de Tau à la tubuline. La phosphorylation de Tau permet également de moduler les interactions entre Tau et ses protéines partenaires telles que la kinésine 1 et la tyrosine kinase Fyn (Cuchillo-Ibanez et al., 2008; Lee et al., 1998) et influence aussi très probablement sa localisation subcellulaire.

De nombreuses kinases et phosphatases régulent la phosphorylation/déphosphorylation de Tau. Parmi les kinases, on peut citer les kinases de la famille des GSK3 (*Glycogen-synthase kinase 3*) (Hanger et al., 1992), des MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) (Holzer et al., 2001), et les *cyclin dependent kinases* dont la cdk5 (Baumann et al., 1993; Hamdane et al., 2003). Ces kinases vont phosphoryler les sites sérine et thréonine de Tau. Les sites tyrosine sont phosphorylés entre autre par des tyrosines kinases de la famille Src, telles que les protéines Fyn, Src et Lck (Derkinderen et al., 2005; Lee et al., 2004) ainsi que la kinase abelson (ALB1 / c-Abl) (Derkinderen et al., 2005).

Parmi les phosphatases impliquées dans la déphosphorylation de Tau, on peut citer PP1, PP2A, PP2B et PP5 (Liu et al., 2005) où PP2A semblerait être la principale phosphatase régulant la déphosphorylation de Tau (Goedert, 1998).

Chapitre 2 - Tau : de la protéine à la pathologie

I. LES PROTEINES TAU PATHOLOGIQUES

Dans certaines conditions pathologiques, les phénomènes de phosphorylation sont dérégulés et les protéines Tau sont hyper et anormalement phosphorylées. L'hyperphosphorylation correspond à une augmentation de la phosphorylation sur des sites normalement phosphorylés. La phosphorylation anormale correspond à l'apparition d'un petit nombre de groupements phosphates sur des sites non phosphorylés en conditions « normales ». Ces sites sont les Ser212 et Thr214, la Thr231 ainsi que de la Ser422 (Figure 5). Ainsi, il est possible de distinguer les protéines Tau pathologiques des protéines Tau « normales » grâce à des outils immunologiques dirigés spécifiquement contre ces sites d'hyperphosphorylation et de phosphorylation anormale. Dans la mesure où les protéines Tau adoptent également des conformations tridimensionnelles particulières, des anticorps conformationnels dirigés contre ces structures pathologiques ont également été développés.

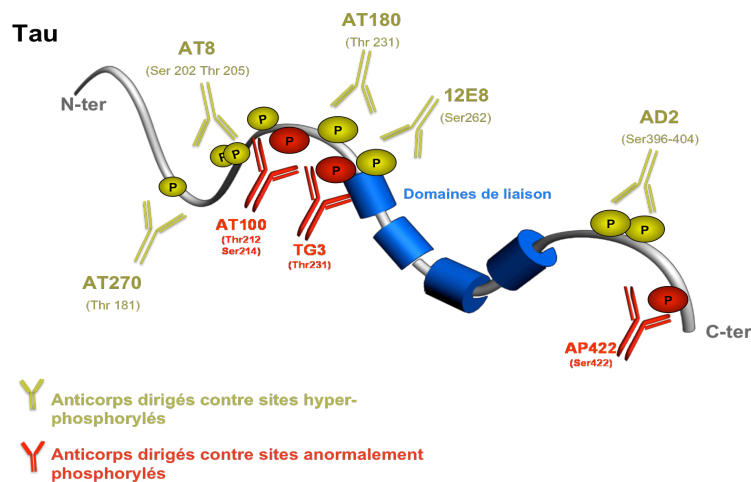


Figure 5. Les protéines Tau pathologiques. Représentation schématique d'une isoforme Tau à quatre domaines de répétitions. Les sites hyperphosphorylés sont représentés en jaune et correspondent à la thréonine 181 ; sérine 202 et thréonine 205 ; thréonine 231 ; serine 262 ; sérine 396-404. Les sites anormalement phosphorylés sont représentés en rouge et correspondent à la thréonine 212-Sérine 214 ; thréonine 231 ; et la sérine 422. Les outils immunologiques reconnaissant ces sites de phosphorylation sont représentés en jaune (sites hyperphosphorylés) et en rouge (sites anormalement phosphorylés).

Ces modifications post-traductionnelles perturbent l'équilibre entre protéines Tau liées aux microtubules et protéines Tau libres dans le cytosol (donc non liées). En effet, au plus Tau est phosphorylée au plus l'interaction Tau/tubuline est faible. Ainsi, la concentration des formes libres devient anormalement élevée, les protéines Tau hyper et anormalement phosphorylées se

replient et adoptent une conformation protéique favorisant la formation d'agrégats insolubles. Ces derniers sont principalement observés dans les neurones mais peuvent également être présents dans les cellules gliales.

II. LA PATHOLOGIE TAU COMME MARQUEUR DE MALADIES NEURODEGENERATIVES

L'accumulation intraneuronale de ce matériel fibrillaire constitué de protéines Tau agrégées est caractéristique d'une lésion histologique communément appelée **dégénérescence neurofibrillaire** (DNF) (Figure 6). C'est dans la maladie d'Alzheimer, démence la plus courante chez la personne âgée, que la DNF a été le plus décrite. Cependant, il est important de noter qu'elle ne lui est pas spécifique. En effet, la DNF a également été observée chez des personnes âgées, des personnes atteintes de trisomie 21 et dans plus d'une vingtaine de maladies neurodégénératives regroupées sous le terme de « Tauopathies » (Tableau 3).

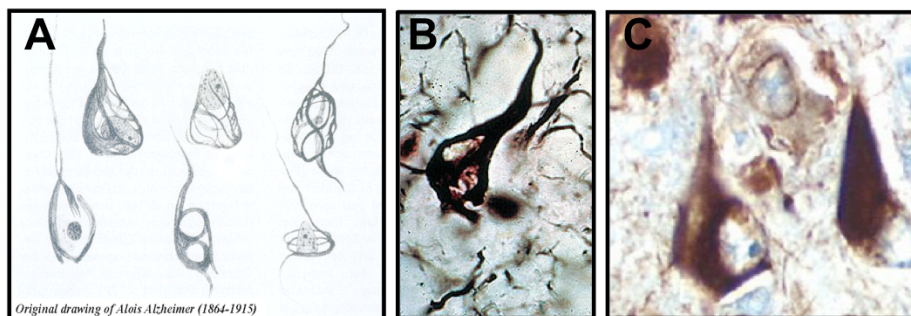


Figure 6. La dégénérescence neurofibrillaire. (A) Représentation schématique d'Alois Alzheimer. (B) Imprégnation argentique. (C) Marquage immunologique avec un anticorps dirigé contre les protéines Tau pathologiques sur une coupe de cerveau humain diagnostiqué pour la maladie d'Alzheimer

Bien que la présence de la lésion soit commune, elle n'est pas similaire d'une Tauopathie à l'autre. En effet, la pathologie Tau peut être exclusive ou dans certains cas accompagnée d'autres lésions histologiques tels que des dépôts amyloïdes ou d'alpha-synucléine. De plus, il existe des différences (i) de distribution topographique et laminaire (ii) de morphologie des filaments et (iii) de composition en isoformes agrégées Tau. L'ensemble de ces différences peut être associé aux divergences des symptômes cliniques. En effet, certaines maladies telles que la paralysie supranucléaire progressive (PSP) et la dégénérescence cortico-basale (CBD) sont caractérisées par un syndrome parkinsonien alors que d'autres révèlent davantage des dysfonctions liées au lobe frontal et au lobe temporal telles que la maladie de Pick et les démences fronto-temporales associées à un parkinsonisme lié au chromosome 17 (FTDP-17).

II. A Distribution topographique et laminaire

Le cerveau est constitué de deux hémisphères cérébraux, d'un cervelet et d'un tronc cérébral qui relie l'ensemble à la moelle épinière. Les deux hémisphères cérébraux sont divisés anatomiquement en quatre lobes externes : le lobe frontal, le lobe pariétal, le lobe occipital et le lobe temporal ; et deux lobes internes : le lobe de l'insula et le lobe limbique. Les quatre lobes externes forment le cortex cérébral (Figure 7 A). Le cortex cérébral présente dans son épaisseur et sur toute son étendue une disposition stratifiée en six couches superposées, de la plus externe à la plus interne (Figure 8) :

- I – couche moléculaire : contient essentiellement des axones et dendrites
- II – couche granulaire externe, composée de neurones granulaires
- III – couche pyramidale externe, composée de cellules pyramidales
- IV – couche granulaire interne
- V – couche pyramidale interne
- VI – couche polymorphe.

Les lésions neurofibrillaires ne sont pas distribuées dans le cerveau de façon homogène au sein d'une même maladie. De plus, leur distribution topographique diffère d'une maladie à l'autre (Tableau 3). Ainsi, bien que les lésions soient toujours retrouvées dans la région sous-corticale, certaines régions du cortex cérébral sont préférentiellement atteintes alors que d'autres le sont moins voire pas du tout. Dans la maladie d'Alzheimer par exemple, les régions les plus touchées correspondent à la formation hippocampique, le cortex transentorhinal et entorhinal, le noyau basal de Meynert et l'amygdale. De plus, le lobe temporal semble plus affecté que les lobes frontal, pariétal et occipital (Figure 7 B). Dans la paralysie supranucléaire progressive (PSP), une autre Tauopathie, la pathologie Tau affecte principalement les régions sous-corticales et dans une moindre mesure le cortex cérébral (lobes frontal et temporal).

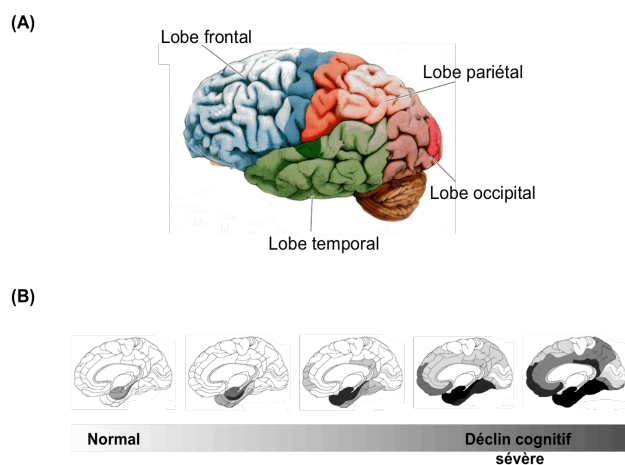


Figure 7. (A) Régions cérébrales et (B) distribution topographique de la DNF dans la MA. (A) Le cortex cérébral est divisé en quatre lobes : les lobes frontal, pariétal, occipital et temporal. Les lobes de l'insula et le lobe limbique appartiennent à la région sous corticale. **(B)** la DNF n'est pas distribuée de façon homogène dans le cortex cérébral chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Elle affecte d'abord la région hippocampique pour s'étendre à terme à l'ensemble du cortex cérébral. La progression de la pathologie évolue avec le temps et est corrélée au déclin cognitif observé chez les patients.

Au sein du cortex cérébral, la distribution laminaire de la pathologie Tau diffère également (Figure 8). Ainsi, les neurones en dégénérescence neurofibrillaire dans la maladie d'Alzheimer sont principalement les neurones pyramidaux des couches II-III et V-VI du cortex cérébral (Hof et al., 1990) alors que dans la maladie de Pick, les agrégats Tau sont plutôt observés dans les cellules granulaires du gyrus dentelé de l'hippocampe et dans les couches supragranulaires II et III de l'isocortex (Hof et al., 1994). Cette différence laminaire suggère que différentes sous-populations neuronales sont affectées d'une maladie à l'autre.

		Maladie d'Alzheimer	Maladie de Pick	PSP/CBD
Couche moléculaire	I			
Couche granulaire externe	II	+	+	+
Couche pyramidale externe	III	+		+
Couche granulaire interne	IV			
Couche pyramidale interne	V	+		
Couche polymorphe	VI	+	+	

Figure 8. Organisation du cortex cérébral en six couches laminaires et distribution de la pathologie Tau. Le cortex cérébral se divise en six couches laminaires composées de différentes sous-populations neuronales. La pathologie Tau n'est pas distribuée de façon homogène au sein de ces six couches pour une même Tauopathie et diffère également d'une Tauopathie à l'autre (exemple ici de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Pick et de la paralysie supranucléaire progressive (PSP) et de la dégénérescence cortico-basale (CBD)).

La distribution topographique de la pathologie Tau évolue avec le temps. Ainsi, il a été observé dans les cerveaux des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, que l'atteinte des différentes structures cérébrales suit un chemin séquentiel et stéréotypé (Braak and Braak, 1991; Delacourte et al., 1999). Elle débute dans le cortex transentorhinal et l'hippocampe, se propage jusqu'aux aires polymodales puis unimodales, pour être enfin distribuée à l'ensemble du cortex dans les stades les plus avancés de la maladie. De façon intéressante, il est important de souligner que cette progression a été corrélée aux déficits cognitifs observés dans la maladie d'Alzheimer (Arriagada et al., 1992; Delacourte et al., 1999; Duyckaerts et al., 1997).

L'évolution stéréotypée et hiérarchisée de la pathologie Tau pourrait refléter un caractère propagateur de la DNF selon un mécanisme de type prion (Frost and Diamond, 2010). La démonstration du caractère propagateur de la pathologie Tau a été apportée par Clavaguera et collaborateurs en 2009. Leur étude *in vivo* montre que l'injection intracérébrale d'extraits de

cerveaux de souris présentant des agrégats Tau dans des souris sauvages induit la formation de nouvelles lésions au niveau des régions cérébrales voisines du point d'injection (Clavaguera et al., 2009; Frost et al., 2009). Cette propagation suivrait les connections cortico-corticales. Bien que les mécanismes impliqués ne soient pas encore bien compris, l'hypothèse d'une propagation de type prion a été évoquée (Frost and Diamond, 2010) où la protéine Tau pathologique adopterait une conformation tridimensionnelle anormale capable d'induire un changement de conformation de la protéine Tau normale (Frost et al., 2009). À terme, les agrégats Tau entraînent la mort lente du neurone. Ces derniers formeraient des « reliquats » ou vestiges des agrégats (Augustinack et al., 2002). Ces dépôts devenus extracellulaires pourraient être internalisés afin d'induire de nouvelles inclusions Tau intracellulaires (Frost et al., 2009). Il n'est pas non plus exclu qu'un autre processus de propagation des agrégats de Tau puisse conduire à la transmission de la dégénérescence neurofibrillaire.

II. B Aspects et composition biochimique des agrégats Tau

À l'échelle de la microscopie électronique, les agrégats Tau s'organisent en matériels fibrillaires, morphologiquement distincts d'une Tauopathie à l'autre. Ainsi, dans la maladie d'Alzheimer, les agrégats Tau forment des filaments appariés en hélice (PHF) alors que dans la maladie de Pick, les agrégats Tau forment ce que l'on appelle les corps de Pick, constitués d'un mélange de filaments droits et torsadés appariés au hasard. Dans la paralysie supranucléaire progressive, les agrégats Tau s'organisent en filaments droits et forment les touffes gliales. Enfin, dans la dégénérescence cortico-basale, les agrégats Tau forment des petits filaments plus larges et moins compacts que les PHF (pour revue voir (Arima, 2006)).

À l'échelle moléculaire, les agrégats Tau diffèrent d'une Tauopathie à l'autre par leur composition en isoformes (Tableau 3). Cette dernière est visualisée après séparation par électrophorèse monodimensionnelle suivie d'un marquage dirigé spécifiquement contre les exons alternatifs 2, 3 et 10, et les formes anormalement phosphorylées de Tau. Il en résulte une classification biochimique (Figure 9), comprenant 4 classes, basée sur la composition en isoformes des agrégats Tau : c'est le code barre des Tauopathies (Sergeant et al 2005).

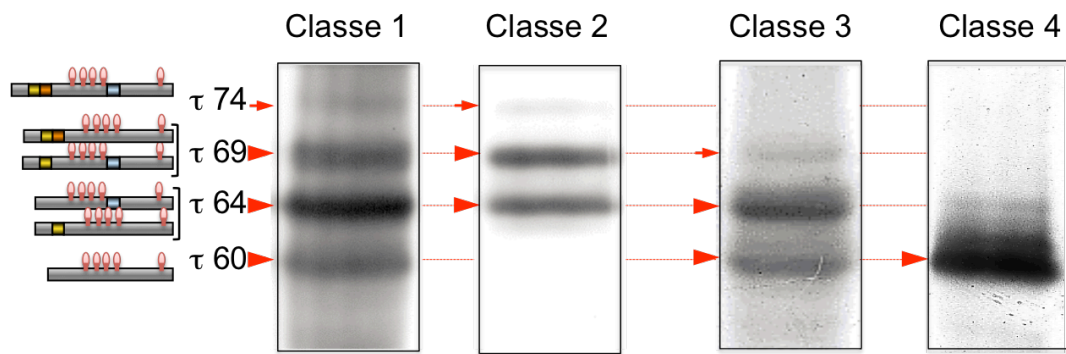


Figure 9. Classification biochimique des Tauopathies.

- *Classe 1 : agrégation de toutes les isoformes de Tau*

Cette classe de Tauopathie se caractérise par un profil biochimique représentant un quartet pathologique migrant à 60, 64, 69 et 74kDa correspondant à l'agrégation des 6 isoformes de Tau. Les protéines Tau pathologiques sont hyper et anormalement phosphorylées. Ces modifications post-traductionnelles anormales changent donc leur masse moléculaire apparente. Ainsi la bande observée à 60kDa correspond à l'isoforme fœtale (2-3-10-), celle à 64 kDa correspond aux isoformes 2+ 3-10- et 2-3-10+, celle à 69 kDa correspond aux isoformes 2+3+ et 2+10+. Enfin, la bande mineure observée à 74kDa correspond à l'isoforme la plus longue (2+3+10+) (Sergeant et al., 1997). Ce profil biochimique a été observé initialement pour la maladie d'Alzheimer mais inclus également d'autres maladies neurodégénératives ([Tableau 3](#))

- *Classe 2 : agrégation des isoformes incluant l'exon 10*

Le profil électrophorétique de la classe 2 se caractérise par un doublet pathologique migrant à 64kDa et 69kDa. Ces bandes correspondent aux isoformes hyper et anormalement phosphorylées incluant l'exon 10. Ce profil biochimique est caractéristique des CBD, PSP et de certaines FTDP-17.

- *Classe 3: agrégation des isoformes excluant l'exon 10*

La classe 3 regroupe certaines formes de FTDP17 et la maladie de Pick. Elle se caractérise par un profil biochimique représenté par deux bandes à 60 et 64kDa correspondant aux isoformes excluant l'exon 10.

- *Classe 4 : agrégation principalement de l'isoforme excluant les exons 2, 3 et 10*

La classe 4 regroupe les Tauopathies caractérisées par un profil biochimique d'une bande à 60kDa. Elle est regroupe les dystrophies myotoniques de type 1 et 2.

Maladies neurodégénératives de type Tauopathie	Caractéristiques histologiques des lésions cerebrales				caractéristiques biochimiques			origine	Références	
	Lésion Tau	lésions neurodegeneratives associées	distribution topographique	distribution laminaire des lésions neuronales dans l'isocortex	cellules	classe Tauopathie	aspect électrophorétique			isoformes
Démence à grains argyrophiles	Primitives		cortex entorhinal, hippocampe, amygdale, insula, cortex temporal	couches II et III	neurones, oligodendrocytes et astrocytes	classe 2	doublet 64 et 69kDa	isoforme 10+	sporadique influence haplotype H1/H1	Tolnay, 2002
Paralysie supranucléaire progressive			noyaux sous corticaux (corps de luys, pallidum et substance noire) cortex frontal	couches II et III	neurones, et astrocytes	classe 2	doublet 64 et 69kDa	isoforme 10+	sporadique influence haplotype H1/H1	Sergeant, 1999
Dégénérescence corticobasale			noyaux sous corticaux puis cortex frontal, pariétal, temporal	couches II, V, VI	neurones pyramidaux, astrocytes et oligodendrocytes	classe 2	doublet 64 et 69kDa	isoforme 10+	sporadique influence haplotype H1/H1	Sergeant, 1999
FTDP-17			région hippocampique, noyaux sous-corticaux et cortex frontal et temporal, pariétal, et tronc cérébral	variable selon mutation	neurones, astrocytes, oligodendrocytes (variable selon mutation)	classe 1, classe 2 et classe 3 selon la mutation	triplet, doublet 60, 64kDa, doublet 64, 69kDa selon la classe	toutes, isoformes 10+, isoformes 10- selon la mutation	familiale	Hutton, 1998; Gasparini, 2007
Maladie de Pick			régions sous corticales, région hippocampique, et néocortex	couches II et VI	neurones granulaires	classe 3	doublet 60 et 64kDa	isoformes 10-	sporadique	Delacourte, 1996
Dystrophie myotonique de type I et de type II			système limbique et lobe temporal		neurones et astrocytes	classe 4	une bande à 60kDa	isoformes foetale	familiale: mutation sur gène <i>DMPK</i> ou <i>znf9</i>	Vermeersch, 1995; Sergeant, 2001; Muraige, 2005
Démence avec Parkinsonisme de la Guadeloupe			noyaux sous corticaux et cortex		neurones	classe 1	triplet	toutes	toxine?/environnement	Caparros-Lefebvre D, 2002
Complexe parkinsonisme /sclérose latérale amyotrophique de l'île de Guam			noyaux sous corticaux et néocortex- région frontale motrice	couches II et III	neurones	classe 1	triplet	toutes	sporadique/environnement	Hof, 1994; Pérez-Tur, 1999 ; Buée Scherrer, 1995
Parkinsonisme post-encéphalitique			région hippocampique, le noyau basal de Meynert, le cortex entorhinal, et le striatum, substance noire, corps de luys,		neurones et prolongements astrocytaires	classe 1	triplet	toutes	post-infectieux	Hof, 1992; Buée Scherrer, 1999
Viellissement	Associées à des dépôts amyloïdes a beta		hippocampe et cortex entorhinal		neurones	classe 1	triplet	toutes	Delacourte, 1999; Braak, 1995	
Maladie d'Alzheimer			formation hippocampique, isocortex temporal, frontal, pariétal et occipital	couches II, III et surtout V et VI	neurones	classe 1	triplet	toutes	sporadique 99%	Buée, 2000; Sergeant, 2005
Syndrome de Down			formation hippocampique et isocortex	couches II, III et surtout V et VI	neurones	classe 1	triplet	toutes	familiale	Hof, 1995
Atrophie multisystémique	Au second plan	dépôts alpha synucléine	noyaux sous corticaux		oligodendrocyte	classe 1	triplet	toutes		
Maladie Niemann-Pick de type C		leucodystrophie	l'hippocampe, l'hypothalamus, et néocortex	couches IV, V et VI	neurones	classe 1	triplet	toutes	familial: mutation sur gène <i>NPC1</i>	Love, 1995
Démence pugilistique		post-traumatique	proche de Alzheimer et syndrome de Down	couches II et III	neurones	classe 1	triplet	toutes	traumatisme	Hof, 1992
Panencéphalite sclérosante subaiguë		leucoencephalite	région sous corticale, le noyau basal de Meynert), hippocampe et cortex cérébral	couches II et III	neurones et oligodendrocytes	classe 1	triplet	toutes	post-virale	
Neuroferritinopathie (Maladie d'Hallervorden-Spatz)		dépôts de fer dans noyaux gris centraux	isocortex		neurones	classe 1	triplet	toutes	familiale: mutation sur gène <i>FTL1</i>	Zarranz, 2006
Maladie de Gerstmann-Strausler-Scheinker		encéphalopathie spongiforme	isocortex		neurones	classe 1	triplet	toutes	familiale: mutation sur gène <i>prion</i>	Tranchant, 1997; Ghetti, 1994

Tableau 3. Classification des Tauopathies

III. LA PATHOLOGIE TAU ET EPISSAGE ALTERNATIF

L'étude biochimique des isoformes Tau pathologiques révèle des profils en isoformes différents d'une Tauopathie à l'autre. Ces différences peuvent s'expliquer de différentes façons :

- Selon le type de population neuronale affectée, l'expression en isoformes de Tau diffère, et donc les isoformes agrégées correspondent aux isoformes exprimées
- Il existe potentiellement une dégradation préférentielle de certaines isoformes
- L'épissage de Tau est perturbé. Le *ratio* en isoforme est changé, et les isoformes agrégées correspondent aux isoformes anormalement exprimées

Nous développerons dans cette partie la troisième hypothèse. En effet, l'identification des mutations sur le gène *MAPT* dans les démences fronto-temporales associées à un syndrome parkinsonien lié au chromosome 17 (FTDP-17) démontre qu'un changement de l'épissage alternatif de Tau est suffisant pour induire l'apparition de la pathologie Tau. Il peut être dû à des dérégulations des éléments *cis* (mutations sur le gène *MAPT* lui-même) ou *trans* (facteurs d'épissage) ou encore par des mutations sur d'autres gènes que *MAPT* tels que celui de la *DMPK*. Dans tous les cas, un changement de *ratio* en isoformes de Tau est observé et est associé à la présence de pathologie Tau.

III. A Dérégulation en *cis*

III. A. 1 mutations affectant le gène Tau

Les maladies dont la cause est un changement en *cis* de l'épissage représentent 10% des maladies génétiques (Cooper et al 2009) parmi lesquelles nous trouvons les FTDP-17. Ce sont des maladies neurodégénératives définies cliniquement par des troubles du comportement tels qu'un changement progressif de la personnalité, une désinhibition frontale, des troubles du langage et un syndrome parkinsonien. D'un point de vue neuropathologique, les FTDP-17 se caractérisent par une importante atrophie des lobes frontaux et temporaux du cerveau. Chez la plupart des patients, on note la présence d'une accumulation de la protéine Tau dans diverses populations neuronales et dans la glie, sans dépôts amyloïdes. Les marquages immunologiques à l'aide d'anticorps dirigé contre la protéine Tau phosphorylée aux sites 199 et 202 (AT8) mettent en évidence des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) dans le cortex mais surtout dans les noyaux sous-corticaux et le tronc cérébral pouvant prendre un aspect particulier entourant le noyau. Cependant il est important de noter qu'une minorité de patients diagnostiqués pour une FTDP-17 ne présentent pas de marquage Tau positif post-mortem . Cette différence s'explique d'un point de vue génétique par la présence de mutations sur le gène *MAPT* ou sur le gène *PGRN*,

situé à proximité du gène *MAPT* sur le chromosome 17 (Boeve and Hutton, 2008). Nous focaliserons notre étude sur les FTDP-17 liées aux mutations sur le gène *MAPT* uniquement. Ainsi, à ce jour, 41 mutations ont été identifiées (<http://www.molgen.ua.ac.be/FTDmutations/>). Il existe plusieurs types de mutations : les mutations non-sens, les délétions, les mutations silencieuses et les mutations introniques. L'ensemble de ces mutations est localisé sur l'exon 10, l'intron qui le suit ou les exons 9, 12, ou 13. Elles ont pour effet de diminuer l'affinité de Tau aux microtubules et/ou favoriser la formation des filaments Tau pathologiques ou encore de modifier l'épissage alternatif de l'exon 10 en altérant le ratio d'isoformes à 3 ou 4 domaines de répétitions. Parmi les mutations affectant l'épissage alternatif de l'exon 10, on retrouve des mutations localisées sur l'intron qui suit l'exon 10. Celles-ci déstabiliseraient la structure secondaire de l'ARN pré-messager replié en boucle au niveau du site 5' d'épissage de l'exon 10 (Grover et al., 1999; Hutton et al., 1998; Spillantini et al., 1998; Stanford et al., 2003). Or des études *in vitro* montrent que l'accès et donc la liaison du U1snRNP sont facilités en l'absence de cette boucle, ce qui par conséquent favoriserait l'inclusion de l'exon 10 (Grover et al., 1999). Un autre mécanisme alternatif a été proposé par D'Souza et collaborateurs qui suggérerait que la formation de cette boucle favoriserait davantage la liaison d'un facteur *trans*-répresseur de l'inclusion de l'exon 10 (D'Souza et al., 1999; D'Souza and Schellenberg, 2000). D'autres mutations localisées sur l'exon 10 de Tau créent une nouvelle séquence *cis*-régulatrice activatrice (mutations N279K et S305N) et/ou détruisent un élément répresseur (mutation L284L) (D'Souza et al., 1999). Enfin il est important de noter que certaines mutations (L266V, G272V, delta280K, E10+19 et E10+29) favorisent davantage l'exclusion de l'exon 10, entraînant ainsi une augmentation de l'expression des isoformes 3R comparativement aux 4R.

Ainsi, l'identification des mutations affectant l'épissage de l'exon 10 a permis de démontrer qu'un changement du *ratio* en isoformes 3R/4R était suffisant pour induire l'apparition d'une pathologie Tau.

III. A. 2 L'haplotype H1 comme facteur de susceptibilité

La variabilité génétique au niveau du locus du gène *MAPT* pourrait également modifier l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 de Tau. En effet, l'haplotype H1, augmenterait le niveau de transcription du gène *MAPT* et favoriserait l'inclusion de l'exon 10 de Tau. Ce changement d'épissage de Tau entraînerait un changement du *ratio* en isoformes Tau incluant l'exon 10 (Vandrovcova et al., 2010). De même, l'haplotype H2, favoriserait l'inclusion des exons 2 et 3 de Tau (Caffrey and Wade-Martins, 2007).

Cette variabilité génétique peut influencer la survenue de Tauopathies sporadiques telles que la PSP et la CBD et de façon putative influencer également le risque de développer une

maladie d'Alzheimer (Baker et al., 1999; Myers et al., 2005). En effet, l'haplotype H1 est considéré comme un facteur de risque de survenue de la pathologie Tau, contrairement à l'haplotype H2, considéré comme protecteur. De nombreuses études démontrent que les patients atteints de PSP et de CBD présentent significativement plus l'haplotype H1 comparativement à l'haplotype H2 (Baker et al., 1999; Evans et al., 2004; Houlden et al., 2001; Pittman et al., 2004; Rademakers et al., 2005). Cependant, il faut également souligner que d'autres études ont montré l'existence de microdélétions présentes uniquement chez les personnes présentant l'haplotype H2 et que ces dernières étaient systématiquement retrouvées chez des personnes présentant un retard mental et des troubles de l'apprentissage (Shaw-Smith et al., 2006; Zody et al., 2008).

III. B Dérégulation en *trans*

Outre les changements d'épissage induits par des mutations des éléments *cis*-régulateurs, des perturbations au niveau de l'activité des éléments *trans*-régulateurs peuvent également contribuer à un changement d'épissage de Tau et être associées à l'apparition d'une pathologie Tau.

III. B. 1 Modulation de l'activité des facteurs d'épissage par la phosphorylation

Les facteurs d'épissage sont des protéines qui favorisent ou au contraire inhibent la reconnaissance du transcrit cible par le complexe d'épissage. Leur localisation et leur activité peuvent être modulées par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation. Par exemple, les protéines de la famille SR interagissent entre elles lorsqu'elles sont phosphorylées à leurs sites RS (résidus serine arginine) et deviennent par conséquent actives. Parmi les kinases impliquées, il a été montré que les kinases CLK (cdc2-like kinase) phosphorylent les facteurs d'épissage de la famille SR : SF2/ASF, SRp55 et SRp75, (Hartmann et al., 2001) , également impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 10 (Andreadis, 2005). De même, il a été montré que la kinase GSK3 β phosphorylait le facteur d'épissage SC35, membre également de la famille des protéines SR, favorisant aussi l'exclusion de l'exon 10 de Tau (Hernandez et al., 2004). Or, dans certaines Tauopathies sporadiques telles que la maladie d'Alzheimer, une perturbation de la balance kinase/phosphatase au profit d'une activité accrue des kinases a été observée parmi lesquelles la GSK3 β . Il n'est donc pas à exclure que ce dysfonctionnement puisse se répercuter sur les facteurs d'épissage impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 de Tau, d'autant plus qu'il a été observé

une dérégulation de l'épissage alternatif des exons 2 et 10 de Tau dans la maladie d'Alzheimer (Conrad et al., 2007).

III. B. 2 Mutations affectant un facteur d'épissage

Des mutations localisées sur les facteurs *trans*-régulateurs peuvent contribuer au développement de pathologies. Nous nous intéresserons ici à l'exemple de la protéine TDP-43 (*Trans Active Response-DNA Binding Protein-43*). TDP-43 est une protéine codée par le gène *TARBDP* dont les fonctions demeurent encore mal définies. Initialement identifiée comme un facteur de transcription inhibant la transcription du VIH-1 (Ou et al., 1995), de plus en plus de données démontrent le rôle de la protéine TDP-43 comme facteur d'épissage. En effet, d'un point de vue structural, TDP-43 possède deux domaines de liaison aux ARNs (RRM1 et RRM2) très conservés et un domaine carboxy-terminal riche en glycine, incluant la protéine dans la famille des facteurs d'épissage de type hnRNP (Chen-Plotkin et al., 2010; Lagier-Tourenne et al., 2010). Ainsi, il a été montré que TDP-43 régulait l'expression de plusieurs transcrits parmi lesquels CFTR (Buratti et al., 2001), et SMN (Chen-Plotkin et al., 2010) via son interaction avec d'autres hnRNPs (Buratti et al., 2005; Freibaum et al., 2010).

L'intérêt pour TDP-43 est survenu suite à la découverte de son implication dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA). La SLA est une maladie neurologique caractérisée par une dégénérescence des motoneurons du cortex cérébral moteur, du cervelet et de la moelle épinière. Il en résulte une perte de motricité ainsi qu'une fonte de la masse musculaire. La SLA est une maladie principalement d'origine sporadique bien qu'il existe quelques formes familiales (5 à 10%). Parmi l'ensemble des mutations identifiées, plus de 30 sont localisées sur le gène *TARBDP*. Cependant, bien que TDP-43 ait récemment été caractérisée comme facteur d'épissage, peu de ses transcrits cibles ont été identifiés. Il demeure donc difficile de faire un lien direct entre le rôle de TDP43 comme facteur d'épissage et la SLA bien que des défauts d'épissage y aient récemment été identifiés (Rabin et al., 2010). Il reste donc encore à établir un lien direct entre ces transcrits et TDP-43.

TDP-43 n'est pas retrouvé agrégée que dans la SLA, des inclusions cytoplasmiques de TDP-43 ayant également été observées dans le cytoplasme des neurones dans d'autres maladies neurodégénératives telles que les démences fronto-temporales lobaires sans pathologie Tau (FTLD-TDP-43, FTLD-FUS), et dans plusieurs Tauopathies telles que des démences fronto-temporales lobaires avec pathologie Tau (maladie à grains argyrophiles, maladie de Pick, dégénérescence cortico-basale), la maladie d'Alzheimer, le syndrome de Down, SLA Guam, (Chen-Plotkin et al., 2010; Lagier-Tourenne et al., 2010; Ule, 2008), mais aussi dans les démences à corps de Lewy et les maladies de Parkinson et Huntington. Dans la maladie

d'Alzheimer, il a été reporté la présence d'inclusions TDP-43 cytoplasmiques dans le gyrus dentelé dans 50% des cas examinés pour lesquels l'atrophie du lobe temporal était plus marquée et l'occurrence de sclérose hippocampique plus fréquente (Duyckaerts et al., 2009). Il est intéressant de noter également que ces cas cliniques présentaient un phénotype pathologique plus avancé.

Ainsi, des données génétiques démontrent que des dysfonctions de TDP-43 sont suffisantes pour induire son agrégation. Seulement, il reste à déterminer si les mécanismes pathologiques relatifs à TDP-43 impliquent une toxicité des agrégats cytoplasmiques ou davantage une perte de fonction nucléaire ou les deux et s'ils peuvent moduler la pathologie Tau. En effet, ces lésions histologiques sont d'ordre secondaire dans les Tauopathies et leur lien avec la pathologie Tau reste à définir.

III. B. 3 Mutations induisant un changement de ratio des facteurs d'épissage

Un changement, même modéré de l'expression d'un facteur d'épissage suffit à induire des changements d'épissage significatifs. De même, de nombreux facteurs d'épissage transitent entre le cytoplasme et le noyau, et leur distribution subcellulaire peut changer en réponse à un stress. Ainsi, le changement de localisation subcellulaire peut également entraîner des changements d'épissage. Ces changements de *ratio* peuvent être dus à des mutations affectant d'autres gènes, c'est ce que l'on observe dans les maladies à gain de fonction des ARN telles que la dystrophie myotonique de type 1 (DM1).

Les maladies à gain de fonction des ARNs font partie des maladies à expansion de microsatellites. Les microsatellites sont des petites répétitions (1 à 10 nucléotides) dont le nombre varie entre les individus. Ils sont responsables de pathologies lorsque leur nombre dépasse un certain seuil. Ces expansions peuvent induire une perte de fonction de la protéine mutée, un gain de fonction toxique lorsque les répétitions sont dans la région codante ou un gain de fonction toxique de l'ARN contenant les expansions. Notons que les deux mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs et que les répétitions pathologiques peuvent avoir un effet à la fois au niveau de l'ARN et au niveau de la protéine. Un gain de fonction de l'ARN muté a été clairement mis en évidence dans quatre pathologies : la dystrophie myotonique de type 1 et de type 2 (DM1, DM2), le syndrome FXTAS (fragile X associated tremor ataxia syndrome) et l'ataxie spinocerebelleuse 8 (Daughters et al., 2009; Garcia-Arocena, et al., 2010; Liquori et al., 2001 ; Ranum and Cooper, 2006) . Il est très fortement suggéré dans d'autres pathologies telles que SCA 10, SCA12 et la maladie d'Huntington de type 2 (HDL2) (Rudnicki et al., 2007; Ranum and Cooper, 2006)

Comme nous le décrirons plus en détail dans le chapitre suivant, l'anomalie génétique responsable de la DM1 modifie le ratio de deux familles de facteurs d'épissage ayant des rôles antagonistes. Il en résulte une dérégulation de l'épissage de nombreux transcrits parmi lesquels celui de Tau. En effet, le laboratoire a précédemment montré **une dérégulation de l'épissage alternatif de l'exon 2 de Tau** caractérisé par une baisse de son inclusion dans le cerveau de patients atteints de DM1 (Sergeant et al., 2001).

Il est intéressant de noter que les patients DM1 présentent, outre l'atteinte musculaire, une atteinte du système nerveux central caractérisée par des troubles de l'humeur (dépression, humeur monotone, apathie et irritabilité) et des troubles cognitifs (troubles de l'attention, des pertes de la mémoire verbale et un déclin des fonctions exécutives) (Modoni et al., 2008; Weber et al., 2010). Ces derniers sont caractéristiques d'une atteinte des lobes frontal, pariétal et temporal rapportés atrophiés en imagerie par résonance magnétique (Di Costanzo et al., 2002; Donahue et al.; Kornblum et al.). D'un point de vue histologique, on observe dans le cerveau la présence de pathologie Tau sous forme de neurofibrilles caractéristiques d'une dégénérescence neurofibrillaire (Maurage et al.; Sergeant et al., 2001; Vermersch et al., 1996). Cette DNF est localisée dans le système limbique incluant l'hippocampe, l'amygdale et l'insula, et dans le cortex temporal.

D'un point de vue biochimique, la quantité des protéines Tau pathologiques est plus élevée dans le cortex entorhinal, l'hippocampe et la plupart des aires temporales des sujets DM1 analysés par Vermersch et collaborateurs (Vermersch et al., 1996). Cependant, il est important de noter qu'elle reste moindre comparativement à celle présente dans les homogénats de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA) et plus abondantes que chez des individus non-malades du même âge, excluant l'hypothèse d'une dégénérescence neurofibrillaire associée au vieillissement (Vermersch et al., 1996). Les sites de Tau hyper et anormalement phosphorylés dans la DM1 sont les mêmes que ceux retrouvés dans la MA, PSP, CBD et les FTDP-17. Cependant, la signature électrophorétique des protéines Tau insolubles agrégées observée dans le cerveau de patients DM1 diffère de celui observé dans le cerveau de sujets atteints des autres Tauopathies : une immunoempreinte monodimensionnelle révèle la présence d'une bande majeure à 60kDa et deux bandes mineures à 64 et 69kDa (Vermersch et al., 1996). Elle s'explique par une agrégation sélective de l'isoforme la plus courte des protéines Tau et dans une moindre mesure de celle des isoformes incluant les exons 2 et 10. De façon intéressante, l'analyse des transcrits Tau dans le tissu cérébral des patients DM1 montre une diminution importante de l'expression des isoformes incluant les exons alternatifs 2, 3 et 10 (Sergeant et al., 2001). Ces résultats suggèrent donc qu'il y a une dérégulation de l'épissage alternatif du transcrit primaire de Tau dans la DM1.

La DM1 est une maladie présentant un grand intérêt pour l'étude de la relation entre épissage alternatif de Tau, fonctionnalité et pathologie Tau. En effet, la mutation responsable de la maladie est localisée ni sur le gène Tau lui-même ni sur un gène codant une protéine impliquée dans son métabolisme. Cependant, tout comme pour les FTDP-17, il semblerait qu'il existe un lien entre changement d'épissage de Tau et pathologie Tau dans la DM1. Ainsi, nous aborderons dans le paragraphe suivant les mécanismes moléculaires impliqués dans la DM1.

Chapitre 3 – La dystrophie myotonique de type 1 : une Tauopathie caractérisée par une dérégulation de l'épissage alternatif

I. GENERALITES

Il y a maintenant un peu plus de 100 ans que Steinert (Steinert, 1909) et Batten et Gibb (Batten F, 1909) décrivent de façon indépendante les troubles caractéristiques de la dystrophie myotonique (DM). Ils observèrent au niveau du muscle squelettique une myotonie, un affaiblissement du tonus musculaire et une atrophie. Par la suite, une évaluation clinique plus approfondie révéla le caractère multisystémique de la maladie : outre le muscle, d'autres organes étaient affectés tels que le cœur, l'appareil respiratoire, l'appareil digestif, le système endocrinien et le système nerveux central.

I. A. Génétique

La DM est une maladie héréditaire à transmission autosomique dominante, de pénétrance complète mais d'expression très variable. Il existe deux types de DM qui se distinguent par leurs anomalies génétiques. L'anomalie génétique de la dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est localisée sur le chromosome 19, dans la région 3' UTR du gène *DMPK* (dystrophia myotonica-protein kinase). Elle est caractérisée par la présence d'une expansion anormale de répétitions CTG instables (Brook et al., 1992; Fu et al., 1992; Mahadevan et al.). L'anomalie génétique de la dystrophie myotonique de type 2 (DM2) est localisée sur le chromosome 3, dans l'intron 1 du gène *ZNF9*. Elle correspond à une expansion anormale de quadruplets CCTG (Liquori et al., 2001). Nous focaliserons notre étude sur la DM1 uniquement.

Chez un individu sain, la région 3'UTR de la *DMPK* contient entre 5 et 37 répétitions CTG alors qu'elle en comprend entre 50 et plusieurs milliers chez les patients atteints de DM1. Le nombre d'expansion est très variable au sein d'un même individu. En effet, il a été observé que le nombre d'expansions était plus important dans le tissu musculaire, le cerveau, les testicules et le foie comparativement aux cellules leucocytaires (Thornton et al., 1994). Il a été observé également une grande variabilité au sein d'un même organe tel que le cerveau où le nombre d'expansions varie de 300 à plus de 3000 d'une région à une autre (Sergeant et al., 2001). On parle de mosaïcisme qui peut être expliqué par un phénomène **d'instabilité somatique** dû à la variation du nombre de CTG transmis aux cellules filles lors de la mitose (il augmente le plus souvent mais peut également diminuer plus rarement).

La taille de l'expansion est inversement corrélée à l'âge de début de la maladie, mais l'est positivement à la sévérité des symptômes cliniques (Harper, 2001). Chez les patients atteints de DM1, les expansions pathologiques sont particulièrement instables et leur taille croît avec le nombre de générations, pouvant conduire aux cas les plus sévères (cas congénitaux). C'est le **phénomène d'anticipation** (Harper et al., 1992). De plus, le niveau d'instabilité des répétitions CTG dépend du sexe (on parle d'**instabilité germinale**, plus importante chez la femme que chez l'homme) et de la taille des répétitions du parent transmetteur (Ashizawa et al., 1994; Lavedan et al., 1993).

I. B. Épidémiologie

La DM1 est une maladie rare (moins d'un cas sur 2000) dont la prévalence varie de un cas sur 100000 au Japon jusqu'à un cas sur 500 dans des régions spécifiques telles que le Québec (Turner and Hilton-Jones, 2010). En Europe, la prévalence de la DM1 est d'environ 5 cas pour 100 000 habitants et son incidence est estimée à 1 cas pour 8000 naissances, ce qui en fait la myopathie la plus fréquente chez l'adulte.

I. C. Aspects cliniques

La DM1 touche aussi bien les femmes que les hommes. L'expression des symptômes est très variable d'une personne à l'autre, y compris parmi les membres d'une même famille. Ainsi, on distingue différentes formes de DM selon les symptômes cliniques et l'âge d'apparition des signes.

La forme congénitale. C'est la forme la plus sévère, à début anténatal (Harley et al., 1992). A la naissance, l'enfant présente des troubles de succion et de déglutition, une détresse respiratoire qui peut être à l'origine de son décès. Le risque d'un retard psychomoteur est très élevé et précède de plusieurs années les troubles musculaires. Chez les enfants qui survivent, le taux de mortalité est très élevé vers l'âge de 30-40 ans dû aux troubles graves cardio-respiratoires.

La forme infantile. Elle débute avant l'âge de 10 ans mais est souvent difficile à diagnostiquer dû à l'absence de myotonie et de troubles neurologiques, et d'un historique familial négatif (Turner and Hilton-Jones, 2010). Les enfants atteints présentent cependant une faiblesse musculaire et un retard intellectuel modéré.

La forme classique adulte. C'est la forme la plus répandue. Elle débute habituellement entre 30 et 40 ans mais peut se manifester dès l'adolescence. Elle affecte principalement le tissu musculaire mais également d'autres organes tels que le cœur, l'appareil respiratoire, l'appareil digestif, le système endocrinien et le système nerveux central.

La forme tardive bénigne. La personne est porteuse de l'anomalie génétique mais n'en manifeste aucun signe. La myotonie et la faiblesse musculaire sont rarement présentes. La

cataracte est le signe le plus fréquent, mais peu discriminatoire chez le sujet âgé. Ainsi, la véritable identification de ces sujets transmetteurs est le conseil génétique.

I. D. Traitements

Pour l'instant, il n'existe aucun traitement permettant de prévenir, retarder ou guérir la maladie. L'ensemble des traitements existants ne sont que symptomatiques et permettent de réduire le risque de mort subite par un suivi cardiologique rigoureux et l'éventuelle installation de pacemaker ainsi que de soulager le patient dans la vie quotidienne. Le diagnostic pré-implantatoire pour la procréation assistée est également envisagée pour les couples porteurs de la mutation.

II. EFFETS DE LA MUTATION ET MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES

L'anomalie génétique responsable de la DM1 présente la particularité d'être localisée dans une région non codante et non promotrice, excluant ainsi l'hypothèse d'un gain de fonction toxique de la protéine mutée. Ainsi, de nombreuses questions furent soulevées quant aux mécanismes physiopathologiques conduisant au phénotype multisystémique complexe de la DM1. C'est grâce au développement de nombreux modèles cellulaires et animaux que les mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la DM1 ont pu être abordés.

La mutation agit (1) en *cis*, principalement en modifiant localement la structure chromatinienne et donc l'expression du gène muté et des gènes voisins et (2) en *trans*, les expansions de triplets CUG forment des agrégats ribonucléoprotéiques appelés *foci* (Figure 10) qui vont indirectement modifier l'expression de certains gènes et l'épissage alternatif de plusieurs transcrits.

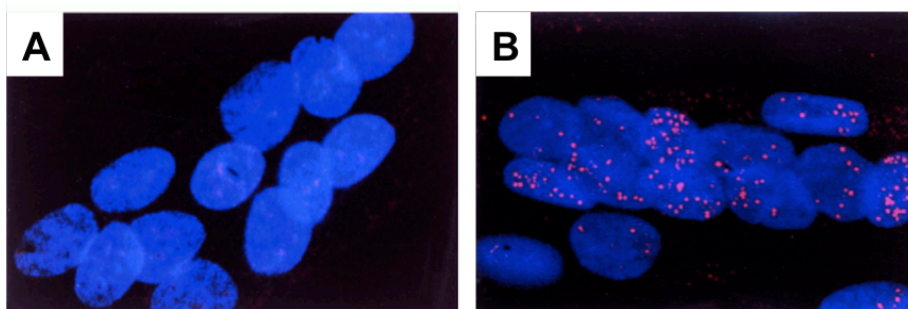


Figure 10. Visualisation des inclusions ribonucléoprotéiques (*foci*) d'après Davis et al., 1997 (Figure 4). Les expansions CUG ont été visualisées par hybridation *in situ* après marquage avec une sonde fluorescente CAG30-Cy3 dans des myoblastes issus de patients sains (A) ou atteints de DM1 (B). Les expansions CUG forment des inclusions ribonucléoprotéiques.

II. A. Effets cis

II. A. 1 Effet sur la transcription bidirectionnelle

Le développement de nouvelles technologies d'étude du transcriptome a permis de révéler l'existence d'un nombre croissant de transcrits antisens (He et al., 2008). Ces derniers peuvent être traduits en protéine ou participer à la régulation de l'expression des gènes. Une étude menée par Cho et collaborateurs a mis en évidence l'existence d'un brin antisens sur le locus DM1 (Cho et al., 2005). Ce brin antisens est transcrit en présence des répétitions CTG pathologiques qui perturbent la structure chromatinienne et facilitent donc le recrutement du complexe de transcription. Ce transcrit pathologique contient plusieurs cadres ouverts de lecture, mais aucun codant une putative protéine polyQ. De plus, l'existence d'une protéine correspondante n'a pu à ce jour être démontrée. Cependant, il est important de souligner que ce transcrit antisens n'existe qu'en présence des répétitions CTG, et est susceptible d'être traduit en protéine. Il serait donc extrêmement intéressant d'identifier et caractériser la fonction de ces transcrits. Un même phénomène est retrouvé dans l'ataxie spinocérébelleuse de type 8 (SCA8). SCA8 est une maladie neurodégénérative affectant principalement le cervelet, à transmission autosomale dominante. La mutation correspond à une expansion CTG-CAG localisée dans la région 3'UTR du gène ATXN80S. Plusieurs études démontrent que le locus SCA8 muté est soumis à une transcription bidirectionnelle : le brin sens (CAG) produit des protéines ataxin8 polyQ pathologiques alors que le brin antisens (CUG) forme des agrégats ribonucléoprotéiques similaires à ceux retrouvés dans la DM1 (Daughters et al., 2009; Moseley et al., 2006). Les mécanismes pathologiques impliqués dans SCA8 seraient donc doubles : un gain de fonction toxique des protéines et des ARNs.

II. A. 2 Effet sur la transcription du gène *DMPK* et des gènes voisins *SIX5* et *DMDW*

Le gène *DMPK* (*Dystrophia myotonica protein kinase*, MIM 605377) est localisé sur le bras long du chromosome 19 en position 19q13.32 entre les gènes *DMWD* (*Dystrophia Myotonica containing WD repeat motif*, MIM 609857) et *DMAHP/SIX5* (*DM locus-associated homeodomain protein/SIX5*, MIM 600963). Il est constitué de 15 exons répartis sur 13 kb et génère 6 principaux transcrits par épissage alternatif (Groenen et al., 2000). L'expression de 4 de ces transcrits est ubiquitaire et non tissu-dépendante alors que deux d'entre eux sont exprimés principalement dans le muscle lisse (Groenen et al., 2000). Le gène *DMPK* code une protéine kinase de type sérine/thréonine kinase. Elle est impliquée dans la dynamique du cytosquelette, l'homéostasie calcique, et la physiologie musculaire (Kaliman and Llagostera, 2008). Son

absence dans des modèles de souris transgéniques ou cellulaires démontre qu'elle est essentielle à l'organisation du muscle squelettique (Reddy et al., 1996) ainsi qu'à la différenciation des myoblastes (Furling et al., 2001).

Chez les patients DM1, une baisse de la transcription du gène muté *DMPK* (Carango et al., 1993; Fu et al., 1993; Maeda et al., 1995; Novelli et al., 1993) et des gènes voisins *SIX5/DMAHP* et *DMWD* (Alwazzan et al., 1999; Klesert et al., 1997; Thornton et al., 1997) a été rapportée. La présence des expansions favoriserait localement la **formation de nucléosomes et donc la compaction de l'ADN en hétérochromatine** (Otten and Tapscott, 1995; Wang et al., 1994). Il en résulterait une inhibition de la transcription du gène voisin *SIX5/DMAHP*. La baisse d'expression de la protéine DMPK s'expliquerait davantage par la formation d'inclusions ribonucléoprotéiques retenant dans le noyau le transcrit muté (Davis et al., 1997).

Cependant, l'haploinsuffisance des protéines DMPK et SIX5 ne permet pas d'expliquer le caractère multisystémique de la DM1. En effet, les souris transgéniques *DMPK*^{-/-} présentent une légère myopathie et de légers troubles de conduction cardiaque, ce qui démontre que l'absence de la protéine ne reproduit que partiellement le phénotype DM1 (Jansen et al., 1996; Reddy et al., 1996). De même, l'inactivation génétique de l'expression de *DMHAP/SIX5* ne reproduit que très partiellement les symptômes observés chez les patients atteints de DM1, à savoir une cataracte et une atrophie testiculaire (Klesert et al., 2000; Sarkar et al., 2000).

Ainsi, les effets *cis* de la mutation (expression réduite de DMPK, SIX5 et DMWD) semblent avoir des conséquences restreintes. Ils n'expliquent pas les phénomènes d'anticipation ni les différentes formes de la DM1 et n'expliquent que partiellement le caractère multisystémique de la DM1.

II. B Effets *trans*

II.B.1 Le gain de fonction toxique des ARNs mutés et structure des triplets CUGs

Bien que la mutation perturbe l'export du transcrit DMPK muté et donc sa traduction en protéine, l'absence de la protéine DMPK ne reproduit pas la maladie. Les mécanismes physiopathologiques de la DM1 impliquent donc spécifiquement répétitions CUG qui confèrent aux ARN mutés un gain de fonction toxique. Plusieurs évidences expérimentales appuient cette hypothèse parmi lesquelles la génération de modèles animaux transgéniques. En effet, que les répétitions CTG soient insérées dans la région 3'UTR d'un gène non impliqué dans la DM1 (*actine*) ou dans celui de la *DMPK*, les souris reproduisent toujours les symptômes majeurs observés dans la DM1 dont la myopathie et la myotonie (Mankodi et al., 2000; Seznec et al., 2001) (Tableau 4). De plus, l'identification de la mutation responsable de la dystrophie

myotonique de type 2 (DM2) a apporté un deuxième argument solide en faveur de cette hypothèse (Liquori et al., 2001). La DM1 et la DM2 sont deux maladies neuromusculaires multisystémiques présentant des symptômes cliniques similaires. Or la mutation responsable de la DM2 est localisée sur un gène autre que celui de la DM1 : le gène *ZNF9*, sur le chromosome 3. De plus, le motif (quadruplet CCTG) et la localisation dans une région non codante (intron 9) suggèrent un mécanisme commun entre DM1 et DM2 de gain de fonction toxique des ARN mutés.

Alors que l'allèle sauvage *DMPK* est transcrit en ARN simple brin puis exporté dans le cytoplasme, l'allèle muté contenant plus de 50 répétitions CTG est également transcrit mais s'arrange en double-brin antiparallèle (Leppert et al., 2004; Michalowski et al., 1999; Mooers et al., 2005; Napierala and Krzyzosiak, 1997) dont la stabilité croît avec le nombre de répétitions (Miller et al., 2000). Les répétitions CUGs forment des motifs réguliers et bien définis où les paires G-C forment des liaisons stables de type Watson & Crick alors que les paires d'uridines U.U mésappariées sont plus lâches (Kiliszek et al., 2009; Mooers et al., 2005). Le transcrit muté est retenu dans le noyau et forme des inclusions ribonucléoprotéiques stables appelées *foci* (Davis et al., 1997). Ainsi, la conformation en double-brin et la rétention nucléaire de l'ARN muté favoriseraient la fixation de protéines nucléaires possédant un domaine de liaison aux motifs CUG. On retrouve, parmi ces protéines, des facteurs de transcription tels que SP1, STAT3, STAT4 et RAR α (Ebraldze et al., 2004) et des facteurs d'épissage de la famille MBNL (Fardaei et al., 2001; Jiang et al.; Miller et al., 2000). Leur perte de fonction due à leur déplétion du nucléoplasme et/ou cytoplasme entraînent des dérégulations de la transcription et de l'épissage alternatif. Ce mécanisme est appelé **effet *trans*-dominant des CUG**.

Equipe/ lignée	Transgène			Expression tissulaire	Foci	CUG-BP1	MBNL1	Epissage	Symptômes	Références	
	promoteur	gène	répétitions								
Thornton HSA ^{LR}	HSA (human skeletal actin)	HSA (Human skeletal actin) -insertion dans la région 3'UTR	LR= long repeat: 250 CTG ininterrompus SR= short repeat: 5 CTG	muscle squelettique	nucléaires			sequestration dans les foci	dérégulation de l'épissage	myotonie, myopathie	mankodi, 2000; Lin, 2006; Kanadia 2006, Du, 2010
Cooper EpA960/HSA-Cre-ER ^{T2}	CMV	DMPK exon 15 (3'UTR)	960 CTG interrompus - CTCGA tous les 20 CTG	cœur (expression CRE cœur spécifique)+inductible (tamoxifen)	nucléaires	augmentation CUGBP1 et ETR3		sequestration	tnnt2, fxrh&	cardiomyopathie, arythmie, dysfonctionnement systoliques et diastoliques	Wang, 2007
				muscle squelettique (expression CRE muscle spécifique)+inductible (tamoxifen)	nucléaires	augmentation CUGBP1	colocalisation	clcn1, serca, cypher, Ank2, Capzb, Fxr1	myotonie, dégénérescence musculaire	Orengo, 2008	
Gourdon	DMPK	DMPK -amplifié à partir d'un patient	300	relié à l'expression de DMPK	nucléaires				tau	myotonie, retards de croissance	Seznec, 2001
			550						faiblesse musculaire et perte de la masse musculaire	Vignaud, 2010	
			700						petite taille	Gomes-Pereira, 2007	
Mahadevan	DMPK tétracycline inductible et reversible	GFP-DMPK exon 15	5	relié à l'expression de DMPK	non	augmentation dans le muscle mais pas dans le cœur	non	clcn1, Tnnt3, Tnnt2, Fxr1 mais pas dans le cœur		mort 3-4 semaines après induction du transgène, atteinte musculaire et cardiaque	Mahadevan, 2006; Yadava, 2008
			200		nucléaires						
Redy	alpha myosin heavy chain	beta galactosidase	400	cœur	cytoplasmiques	augmentation		colocalisation	non	troubles cardiaques modérés	Dansithong, 2008

Tableau 4 Modèles de souris transgéniques impliquant le rôle pathologique des répétitions CUG_{n>50}

II. B. 2 Effet trans sur l'expression des gènes

Récemment, deux études transcriptomiques ont été menées à partir de tissu musculaire issu des souris transgénique HSA^{LR} exprimant 250 répétitions CTG. Elles démontrent par des analyses de puces à ADN un changement d'expression d'un grand nombre de transcrits (Du et al., 2010 ; Osborne et al., 2009) suggérant **une dérégulation de la transcription** ou un **problème de stabilité des ARN messagers**. Comme cela fut proposé en 2007 par Krol et collaborateurs, les auteurs n'excluent pas la génération de petits ARN interférents dans leur modèle de souris. En effet, Krol et collaborateurs démontrèrent que la structure secondaire de type épingle à cheveux des répétitions CUG était la cible du complexe Dicer (ribonucléase impliquée dans la génération de petits ARN interférents). Ainsi, de petits ARN poly(CUG) sont générés à partir des longues répétitions pathologiques clivées par le complexe Dicer. Ces derniers se comporteraient comme des petits ARN interférents éteignant l'expression de gènes cibles possédant des motifs CAG (Krol et al., 2007). Cependant, aucun petit ARN CUG n'a pu être détecté dans leur modèle de souris transgénique. De plus, parmi l'ensemble des transcrits dérégulés, seul un transcrit possédait un motif CAG pouvant donc être une potentielle cible de ces petits ARN interférant CUG. Ces résultats suggèrent que ce mécanisme d'extinction des gènes n'explique que partiellement les dérégulations observées (Osborne et al., 2009). De plus, parmi l'ensemble des transcrits dont l'expression varie, aucun motif consensus pour un facteur de transcription n'a pu être mis en évidence. Ainsi, bien qu'une dérégulation de l'expression des gènes soit clairement établie dans les modèles de souris transgéniques et également retrouvée chez des patients atteints de DM1 (Botta et al., 2007), les mécanismes moléculaires impliqués demeurent encore inconnus. Cependant, il n'est pas à exclure un rôle dans la physiopathologie des facteurs retrouvés séquestrés dans les *foci*, parmi lesquels des facteurs de transcription (Ebraldize et al., 2004) ou encore des protéines assurant la stabilité et ou le transport des ARN messagers tels que MBNL2 ou CUG-BP1 encore appelée EDEN-BP chez le Xénope, jouant également un rôle dans la stabilité des ARNs (Paillard et al., 2003; Adereth et al., 2005; Fardaei et al., 2001).

II.B.3 Effet trans sur l'épissage alternatif

Le mécanisme moléculaire le plus généralement admis pour expliquer la physiopathologie de la DM1 est l'effet *trans*-dominant des répétitions CUG sur l'épissage alternatif. En effet, de nombreux transcrits sont anormalement épissés et ce dans plusieurs tissus dont le muscle squelettique, le cerveau et le cœur (Tableau 5). Le premier transcrit décrit comme anormalement épissé dans la DM1 fut la troponine T cardiaque (cTNT) (Philips et al.,

1998). La troponine T constitue avec les troponines C et I le complexe des troponines. Au sein de ce complexe, cTNT agit avec la tropomyosine et régule la contraction musculaire. L'épissage de cTNT génère quatre isoformes exprimées dans le cœur et régulées selon le stade de développement. Ces isoformes diffèrent par l'inclusion ou pas des exons alternatifs 4 et 5. Dans la DM1, l'exon 5 est anormalement inclus (Philips et al., 1998), ce qui semblerait affecter les propriétés contractiles du muscle (McAuliffe et al., 1990). Ainsi, il est intéressant de souligner que ce changement d'épissage peut être corrélé aux symptômes cliniques observés chez les patients DM1 (dans ce cas ci, aux anomalies cardiaques).

Un phénomène similaire fut reporté également pour le récepteur à l'insuline (INSR) pour lequel il a été observé une baisse d'inclusion de l'exon 11 dans la DM1 (Savkur et al., 2001). Il en résulte une protéine moins fonctionnelle quant à la signalisation de l'insuline ce qui a été associé à une insulino-résistance observée cliniquement chez les patients (Kellerer et al., 1992).

Enfin, un autre exemple concerne l'épissage alternatif du transcrit CLCN1, codant pour un canal chlore spécifique du muscle. Il a été montré que l'intron 2 et les exons localisés entre les exons 6 et 7 (exons 6b et 7a) du transcrit CLCN1 étaient anormalement inclus dans le transcrit mature (Charlet et al., 2002). Ces séquences contiennent des codons stop prématurés. Il en résulte donc des protéines tronquées non fonctionnelles. Or l'absence de cette protéine est associée à des troubles de conduction chlorique et à la myotonie (Charlet et al., 2002; Mankodi et al., 2002). De façon intéressante, la correction de ce défaut d'épissage permet de restaurer la myotonie dans le modèle de souris transgénique HSA^{LR} (Wheeler et al., 2007).

La plupart des études menées sur la DM1 se sont focalisées sur le tissu musculaire. Ainsi, alors que le nombre de transcrits anormalement épissés dans le tissu musculaire DM1 croît (Du et al., 2010), seuls quatre transcrits ont été identifiés dans le cerveau humain adulte dont Tau, NMDAR1, MBNL1 et APP (Tableau 5). Qu'ils soient exprimés dans le muscle ou dans le cerveau, il a été observé que le profil pathologique d'épissage de ces transcrits à l'âge adulte correspondait souvent à un profil d'épissage de type fœtal (Buj-Bello et al., 2002; Charlet et al., 2002; Jiang et al., 2004; Kanadia et al., 2003b; Philips et al., 1998; Savkur et al., 2001; Sergeant et al., 2001). De façon intéressante, la plupart de ces transcrits possèdent au sein de leurs séquences *cis*-régulatrices des motifs consensus liant les facteurs d'épissage de la famille CELF (U/G) et MBNL (YGCY, où Y est une pyrimidine). Ces deux familles, à effets antagonistes, jouent un rôle essentiel dans la transition « épissage fœtal - épissage adulte » (Kalsotra et al., 2008; Ladd et al., 2001; Lin et al., 2006). De plus, alors que l'expression des CELF diminue entre le stade fœtal et l'âge adulte, celle de MBNL augmente (Kalsotra et al., 2008). Parallèlement à ces données, il a été observé dans la DM1 une augmentation de l'expression de CUGBP-1 (protéine membre de la famille CELF) (Wang et al., 2007) ainsi que la séquestration de MBNL1 par les expansions CUG (Miller et al., 2000); deux phénomènes qui pourraient expliquer le profil

d'épissage de type foetal observé dans la DM1.

organe	pre-mRNA	exon/intron dérégulé	inclusion/exclusion	References
cœur	Troponine T cardiaque (TNNT2/cTNT)	exon 5		Philips et al.,1998
muscle squelettique	récepteur à l'insuline (INSR)	exon 11	exclusion	Savkur et al., 2001
	Canal chlore (CLCN-1)	intron 2	inclusion	Charlet et al., 2002; Mankodi et al.,2002
		exon 7a	inclusion	
	Troponine T squelettique (TNNT3)	foetal exon	inclusion	Kanadia et al.,2003
	récepteur à la ryanodine (RyR)	exon 70 (AS I)	exclusion	Kimura et al., 2005
	pompe ATPase 1 Ca2+ du réticulum sarcoplasmique/endoplasmique (SERCA1)	exon 22	exclusion	Kimura et al., 2005
	pompe ATPase 2 Ca2+ du réticulum sarcoplasmique/endoplasmique (SERCA2)	intron 19	inclusion	Kimura et al., 2005
	LIM domain binding 3 (LBB3, ZASP)	11	inclusion	Lin et al., 2006
	titin (TTN)	Zr4	inclusion	
		Zr5	inclusion	
	nebulin-related anchoring protein (NRAP)	12	inclusion	
	calpain 3, CAPN3	16	exclusion	
	attractin-like 1 (ATRNL1, ALP)	5a	exclusion	
		5b	exclusion	
	formin homology 2 domain containing 1 (FHOD1, FHOS)	11a	exclusion	
	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1 (GFPT1, GFAT1)	10	exclusion	
	muscleblind like 1 (MBNL1)	7	inclusion	
	muscleblind like 2 (MBNL2)	7	inclusion	
	Facteur nucléaire I/X (CCAAT-binding transcription factor (NFIX)	123	inclusion	Du et al., 2010
	SET and MYND domain containing 1 (SMYD1)	39	inclusion	
	sperm associated antigen 9 (SPAG9)	39	exclusion	
	gènes de la matrice extracellulaire			
	myotubularin-related protein 1 (MTMR1)	exon 2.1	exclusion	Buj-Bello et al., 2002; Ho et al.,2005
exon 2.3		exclusion		
α-dystrobrevin (DTNA)	exon 11a	inclusion	Nakamori et al.,2008	
	exon 12	inclusion		
cerveau	Tau (MAPT)	exon 2	exclusion	Sergeant et al., 2001
		exon 3	exclusion	Sergeant et al., 2001
		exon 6		Leroy et al., 2008
		exon 10	exclusion	Sergeant et al.,2001; Jiang, 2004
	récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDAR1)	exon 5	inclusion	Jiang et al., 2004, données labo
	amyloid precursor protein (APP)	exon 7	exclusion	Jiang et al., 2004
MBNL1	exon 5	inclusion	Dhaenens et al., 2010	
	exon 7	inclusion		

Tableau 5. Liste des principaux transcrits dérégulés dans la DM1

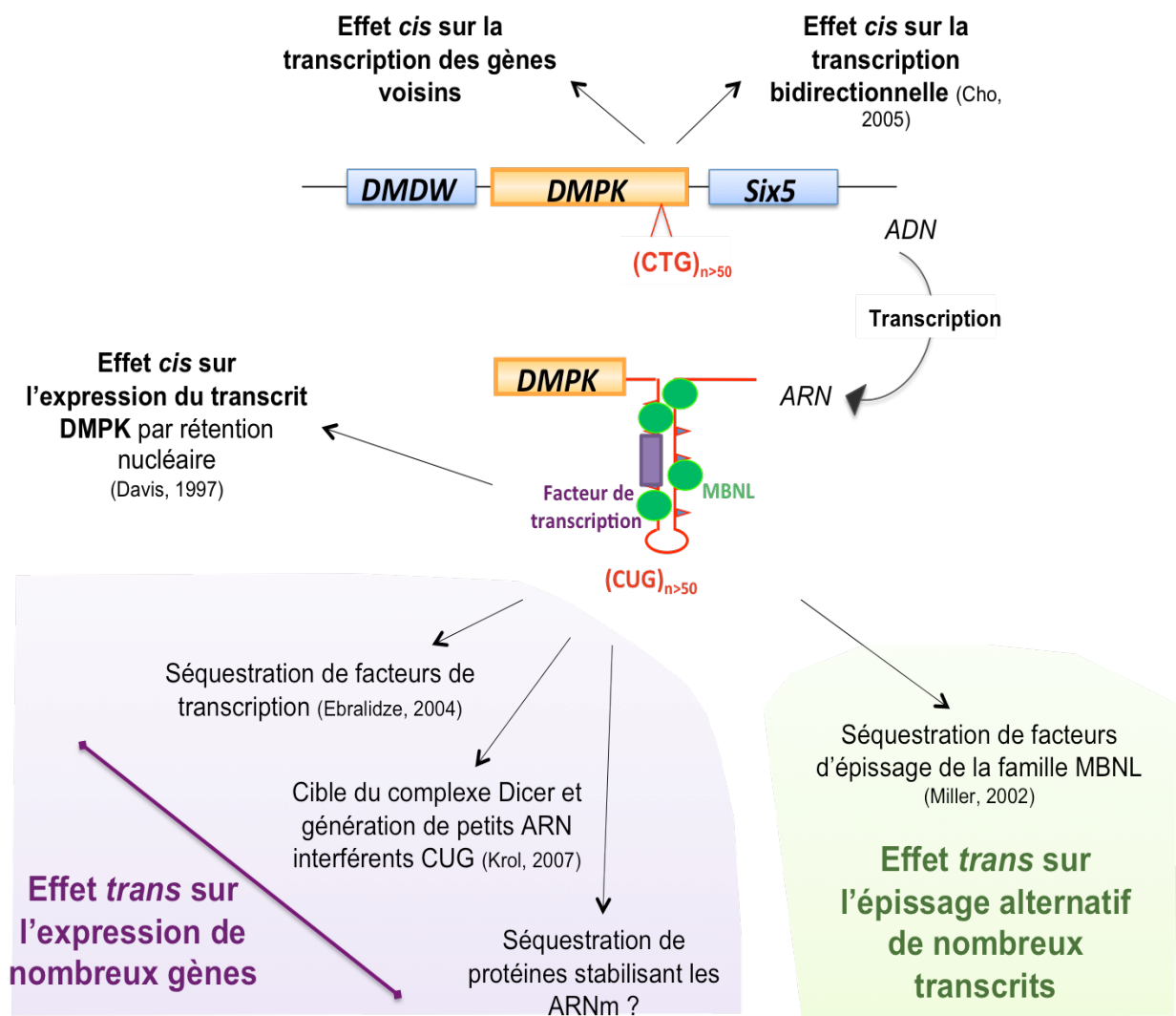


Figure 11. Mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie de la DM1.

L'anomalie génétique DM1 constituée de répétitions (CTG)_{>50} agit au niveau de l'ADN et de l'ARN. Au niveau de l'ADN, les expansions modifient la structure chromatinienne ce qui a pour conséquence d'inhiber la transcription des gènes voisins et de favoriser la transcription d'un brin antisens. Au niveau des ARN, les expansions retiennent le transcrit muté dans le noyau conduisant à l'haploinsuffisance du gène DMPK et séquestre plusieurs protéines possédant un domaine de liaison aux motifs CUG. Parmi ces protéines, on retrouve des facteurs de transcription et d'épissage tels que MBNL1. Les expansions CUG ont un effet trans-dominant sur l'expression de nombreux gènes et sur l'épissage alternatif de plusieurs transcrits. La DM1 est une maladie à gain de fonction toxique des ARN.

Chapitre 4 : LES FACTEURS D'ÉPISSAGE CELF ET MBNL : FONCTIONS NORMALES ET PATHOLOGIQUES DANS LA DM1

De plus en plus d'observations relient les défauts d'épissage observés dans les tissus DM à deux familles de protéines liant l'ARN : la famille CELF (CUG-BP et ETR-3 like factors) et la famille muscleblind-like (MBNL). L'intérêt premier pour ces protéines vient de leur capacité à se lier aux motifs CUG *in vitro* (Lu et al., 1999; Michalowski et al., 1999; Miller et al., 2000; Timchenko et al., 1996). Il a ensuite été clairement démontré que les membres de ces familles liaient l'ARN et régulaient directement l'épissage alternatif de nombreux transcrits dont certains ont été décrits comme dérégulés dans la DM1 (Charlet et al.; Ho et al., 2004; Philips et al., 1998; Savkur et al., 2001). De plus en plus d'arguments vont en faveur d'un gain de fonction des CELF associés à une perte de fonction de MBNL comme évènements déterminants dans l'effet *trans*-dominant des expansions CUGs. Nous aborderons dans ce chapitre le rôle de chacune de ces familles en général et de leur implication dans les mécanismes pathologiques de la DM1.

I. LES PROTEINES CELF

Les protéines CELF (CUGBP-1 et ETR-3 like factors) forment une famille de protéines de liaison à l'ARN simple brin présentant de fortes homologies de séquences et de structures entre elles (Barreau et al., 2006; Gallo and Spickett, 2010; Ladd et al., 2001). Il existe 6 membres : CELF1, CELF2, CELF 3, CELF4, CELF5 et CELF6 dont les différentes nomenclatures sont récapitulées dans le [Tableau 6](#). Dans un souci de clarté, nous nommerons à partir de ce paragraphe CUG-BP1 CELF1 et ETR-3 CELF2. On distingue principalement deux sous-groupes : CELF1 et CELF2 qui présentent une importante homologie de séquence et de structure (76%), et le groupe composé des CELF3, 4, 5 et 6 présentant moins de 50% d'homologies entre elles. L'expression de CELF1, CELF2 et CELF 4 est ubiquitaire (avec un niveau plus élevé dans le cœur, le muscle et le cerveau) et est régulée au cours du développement (Kalsotra et al., 2008; Ladd et al., 2001). CELF3, 5 et 6 sont exprimées principalement dans le cerveau adulte (Barreau et al., 2006; Gallo and Spickett, 2010; Ladd et al., 2001; Vlasova and Bohjanen, 2008).

Nomenclature CUGBP/ETR	Nomenclature CELF	Nomenclature Brunol	Autre
CUG-BP1	CELF1	Brunol2	Nab50, EDEN-BP NAPOR CAGH4, ERDA4, TNRC4
ETR-3 / CUG-BP2	CELF2	Brunol3	
ETR-1	CELF3	Brunol1	
ETR-4	CELF4	Brunol4	
	CELF5	Brunol5	
	CELF6	Brunol6	

Tableau 6. Nomenclature des protéines CELF

D'un point de vue structural, les protéines CELF sont caractérisées par la présence de trois domaines de liaison à l'ARN de type RRM (RNA Recognition Motif) : RRM1, 2 et 3 (Figure 11). Les RRM2 et 3 sont séparés par un domaine non conservé spécifique à la protéine. Les protéines CELF se lient principalement à des simples brins d'ARN riches en séquences G/U. Ces motifs seraient particulièrement plus exprimés dans le muscle squelettique et dans le cerveau adulte (lobe frontal) (Castle et al., 2008). Toutes les protéines CELF régulent le métabolisme des ARN. Elles modulent l'épissage alternatif de leurs transcrits cibles lorsqu'elles sont nucléaires ou régulent la traduction/interviennent dans la stabilité des ARN messagers lorsqu'elles sont cytoplasmiques (Barreau et al., 2006). Un modèle de souris transgénique exprimant un dominant négatif de toutes les CELF démontre leur rôle essentiel dans la physiologie cardiaque. En effet, ces souris présentent des dérégulations de l'épissage alternatif de nombreux transcrits cardiaques ainsi qu'une cardiopathie (Ladd et al., 2005). De façon intéressante, ces troubles sont également observés dans la DM1. De plus, une dérégulation de l'activité des CELFs et plus particulièrement CELF1 et CELF2 a été rapportée. Après avoir brièvement présenté leurs fonctions normales, nous aborderons leurs implications dans la physiopathologie de la DM1.

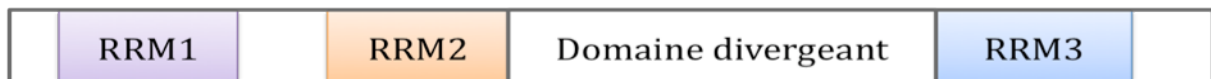


Figure 12. Structure des protéines CELF. Les protéines CELF sont caractérisées par la présence de trois domaines de liaisons aux ARN (RRM1, RRM2 et RRM3) séparés par un domaine divergeant. Ce dernier diffère d'un membre à l'autre.

I. A CELF1

CELF1 est codé par un gène unique (MIM 601074) localisé sur le chromosome 11p11. Il contient 14 exons dont 12 sont codants et génère par épissage alternatif 6 isoformes d'environ 50kDa. CELF1 a une expression ubiquitaire et régulée au cours du développement (Kalsotra et al., 2008; Ladd et al., 2001). Les fonctions de CELF1 sont multiples et dépendent de sa localisation subcellulaire. Dans le noyau, CELF1 agit comme facteur d'épissage (Philips et al., 1998). Dans le cytoplasme, CELF1 agit comme facteur d'initiation de la traduction (Timchenko et al., 2004) et facteur de stabilisation des ARNs messagers en se fixant à des régions AREs (*AU-rich elements*) (Paillard et al., 2003; Timchenko, 1999).

Implication dans la DM1

La surexpression de CELF1 *in vitro* reproduit un profil d'épissage similaire à celui observé dans la DM1 (Charlet et al., 2002; Ho et al., 2005; Kalsotra et al., 2008; Koshelev et al., 2010; Mankodi et al., 2002; Philips et al., 1998; Timchenko et al., 2001a). Parmi les transcrits cibles de CELF1 retrouvés dérégulés dans la DM1, on peut citer CLCN-1 intron 2, TNNT2 exon 5, et IR exon 11 (Charlet et al., 2002; Philips et al., 1998; Savkur et al., 2001).

Un autre effet de la surexpression de CELF1 *in vitro* correspond à l'augmentation de l'expression des transcrits MEF2A (*myocyte enhancer factor 2A*) et p21. MEF2A est un facteur de transcription impliqué dans la myogenèse et p21 une protéine impliquée dans la progression du cycle cellulaire. L'augmentation d'expression de ces transcrits est corrélée aux troubles de différenciation des cellules musculaires observés dans la DM1 (Timchenko et al., 2001b; Timchenko et al., 2004).

Enfin, il est important de souligner qu'une augmentation de l'expression de CELF1 a été observée dans les cellules musculaires et les tissus du muscle squelettique et cardiaque DM1 (Dansithong et al., 2005; Savkur et al., 2001; Timchenko et al., 2001b; Wang et al., 2007). Cette augmentation d'expression est corrélée à une phosphorylation anormale de la protéine *via* l'activation de la voie PKC, ce qui stabiliserait la protéine et/ou inhiberait sa dégradation (Kuyumcu-Martinez et al., 2007; Timchenko et al., 2001b). Les mécanismes d'activation de la voie PKC demeurent cependant encore inconnus.

Le rôle de CELF1 dans la DM1 a définitivement été démontré par la génération de plusieurs modèles de souris transgéniques surexprimant CELF1 (Tableau 7). Ces derniers reproduisent tous les symptômes observés chez les patients atteints de DM1 dont la myotonie et les troubles cardiaques et vont en faveur d'un gain de fonction de CELF1 dans la DM1.

Equipe/ lignée		Transgène		Expression		Epissage	Traduction	symptômes	références
		promoteur	insert	niveau	tissu				
Timchenko		beta actine de poulet	CELF1 humain taggé histidine	de 2 à 10 fois plus	principalement dans le muscle squelettique et plus faiblement dans le cœur		augmentation d'expression de MEF2A, myogenin, p21	retard de croissance, dystrophie musculaire	Timchenko, 2004
Cooper	MCK CELF1	Creatine kinase promoteur	CELF1 humain Nflag	4 à 6 fois plus	cœur et muscle squelettique	Tnnt2, Mtmr1 and Clcn1		observations histologiques: dégénérescence musculaire et noyaux centraux	Ho, 2005
	MHC-rtTA/TRECELF1	CMV		Plus de 4 fois	cœur spécifique+inductible Doxycycline	c10orf97, Mfn2, Capzb and Ppfibp1, cTNT and Ablim1		Dilatation et dysfonctions systoliques du ventricules gauches	Koshelev, 2010
	MDAFrtTA/TRECELF1			8 fois plus	muscle squelettique +inductible doxycycline	Ank2, Cypher, Mtmr1,H2afy, Capzb, Serca1, Ryr1, Gfat		perte de masse musculaire, dystrophie musculaire, faiblesse musculaire	Ward, 2010

Tableau 7. Modèles de souris transgéniques impliquant le rôle pathologique de CELF1

I. B CELF2

La protéine CELF2 a été identifiée pour la première fois dans le cœur fœtal (Hwang et al., 1994). Elle fut ensuite renommée NAPOR (Neuroblastoma apoptosis-related RNA binding protein) pour sa capacité à induire l'apoptose dans les cellules de neuroblastome SH-SY5Y (Choi et al., 1998) puis CUGBP2 pour sa capacité à se lier aux motifs CUG (Lu et al., 1999).

CELF2 (MIM 602538) est codée par un gène unique localisé sur le chromosome 10p14. Il contient 14 exons et génère par épissage alternatif 3 isoformes qui diffèrent par le premier exon (Li et al., 2001). CELF2 a une expression ubiquitaire. Cependant, l'analyse par northern blot de l'ARNm de CELF2 montre une expression plus élevée dans le muscle, le cœur et le cerveau (Atlas and Smolin, 1999; Choi et al., 1998; Li et al., 2001; Lu et al., 1999)

Implication dans la DM1

Bien qu'il n'existe pas de modèles de souris transgéniques surexprimant CELF2 tels que pour CELF1, de nombreux arguments plaident en faveur du rôle de CELF2 dans la DM1. Tout d'abord, CELF2 est fortement exprimée dans les tissus affectés dans la DM1, à savoir, le cœur, le muscle et le cerveau. Ensuite, l'expression de CELF2 est augmentée tout comme celle de CELF1 dans le cœur des souris transgéniques exprimant les expansions CUG (Wang et al., 2007). Enfin, CELF2 se lie aux motifs riches en G/U (Faustino and Cooper, 2005) et régulent l'épissage alternatif de nombreux transcrits dérégulés dans la DM1 dont certains sont similaires à ceux de CELF1 (Charlet et al.; Faustino and Cooper, 2005; Ladd et al., 2001). Ainsi, il a été montré que CELF2 régule l'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT (Ladd et al., 2001).

Parmi les transcrits du cerveau, il a été montré que CELF2 était impliquée dans la régulation de l'épissage alternatif des exons 5 et 21 du récepteur NMDAR1 (Zhang et al., 2002), transcrit retrouvé anormalement épissé dans la DM1 (Jiang et al., 2004) et des exons 2 et 3 de Tau (Leroy et al., 2006b) transcrit également retrouvé dérégulé dans la DM1 (Jiang et al., 2004; Sergeant et al., 2001).

II. LES PROTEINES MBNL

Les protéines MBNL (Muscleblind-like) forment une famille de protéines de liaison à l'ARN très conservées entre espèces (Pascual et al., 2006). Elles sont exprimées chez la drosophile *Drosophila melanogaster* (Artero et al., 1998; Begemann et al., 1997), le ver *Caenorhabditis elegans* (Wang et al., 2008b), le poisson *Takifugu rubripes* (Fernandes et al.,

2007) et le poisson zèbre (Liu et al., 2008), le poulet *Gallus gallus* (Huang et al., 2008), la grenouille *Xenopus tropicalis*, la souris *Mus musculus* et le rat *Rattus norvegicus* (Kanadia et al., 2003b).

II. A Des gènes aux transcrits

Chez l'Homme, la famille MBNL est composée de trois protéines homologues : MBNL1, MBNL2 et MBNL3, codées par trois gènes distincts. Le gène *MBNL1* (MIM 606516) est localisé en 3q25 ; le gène *MBNL2* (MIM 607327) est localisé sur le chromosome 13 et le gène *MBNL3* (MIM300413) est localisé sur le chromosome X. L'organisation génomique de MBNL1, MBNL2 et MBNL3 présente de fortes homologues quant au nombre et à la taille des exons (Fardaei et al., 2002). Prenons par exemple la structure du gène *MBNL1*.

Le gène *MBNL1* est composé de 12 exons numérotés de 1 à 12, parmi lesquels 10 sont codants, les exons -1 et 11 faisant partis des régions non traduites (UTR). Parmi ces 10 exons, les exons 3, 5, 7 et 9 sont alternatifs (Fardaei et al., 2002; Pascual et al., 2006) (Figure 13). L'épissage alternatif de ces exons génère une combinaison d'au moins 10 isoformes dont l'expression est régulée selon le type de tissu et selon le stade de développement (Dhaenens et al., 2008; Kino et al., 2004; Pascual et al., 2006). Ainsi, on remarque que les isoformes excluant l'exon 3 sont minoritaires dans le muscle et le cerveau, et que l'isoforme fœtale correspond à l'isoforme la plus longue incluant tous les exons alternatifs (Dhaenens et al., 2008 ; données Camille Lemerancier/Denis Furling).

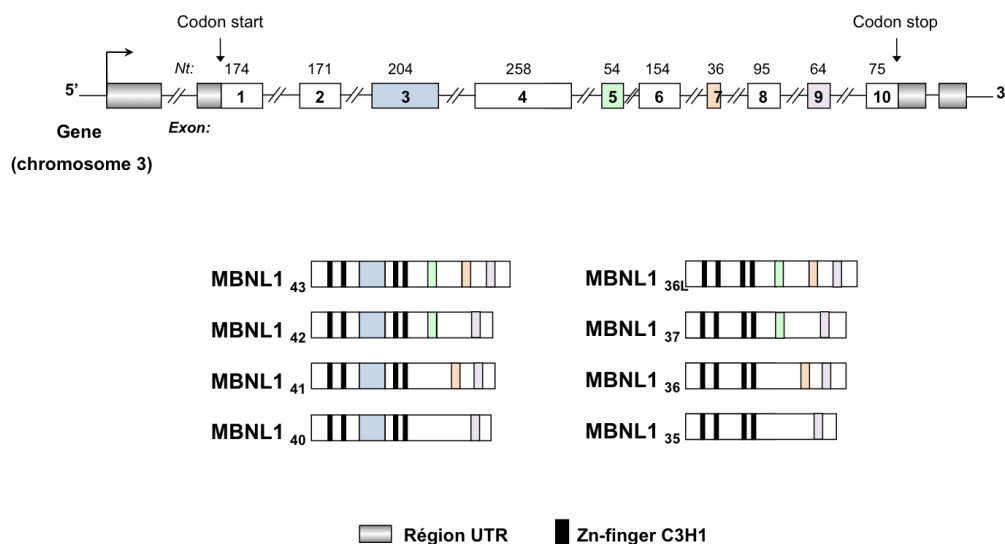


Figure 13. Organisation du gène *MBNL1*. MBNL1 est composé de 12 exons (rectangles) dont 10 sont codants numérotés de 1 à 10. Les exons -1 et 11 font partie des régions non traduites (en gris). Les exons alternatifs sont colorés et correspondent aux exons 3, 5, 7 et 9. Les 4 motifs à doigts de zinc sont représentés par les rectangles noirs.

II. B Les protéines MBNL

II. B. 1 Expression

L'expression des protéines MBNL est régulée selon le type de tissu et selon le stade de développement (Kanadia et al., 2004). MBNL1 et MBNL2 ont une expression ubiquitaire, bien que prédominante dans le muscle, le cœur et le cerveau (Castle et al., 2008; Fardaei et al., 2002). MBNL3 est exprimé principalement dans le placenta, bien que des traces aient été détectées dans d'autres tissus (Fardaei et al., 2002). Enfin, alors que l'expression de MBNL1 et 2 augmente à l'âge adulte, celle de MBNL3 diminue (Kanadia et al., 2003b).

II. B. 2 Fonctions des protéines MBNL

Initialement identifié chez *Drosophila melanogaster*, le gène orthologue *mb1* code une protéine essentielle à la différenciation des photorécepteurs et à celle des cellules musculaires (Artero et al., 1998; Begemann et al., 1997). Depuis leur découverte, les protéines MBNL ont été caractérisées comme des facteurs d'épissage (Ho et al., 2004) impliqués dans la régulation de la transition « épissage foetal - épissage adulte » (Kalsotra et al., 2008; Ladd et al., 2001; Lin et al., 2006). MBNL2 présente la particularité en plus d'être impliqué dans la localisation subcellulaire des ARN, contrôlant ainsi l'expression locale de certaines protéines telles que l'intégrine alpha 3 (Adereth et al., 2005).

II. B. 3 Structure et fonctions de MBNL1

Après épissage du transcrit primaire, MBNL1 est exprimé sous forme de plusieurs protéines isoformes de masse moléculaire théorique comprise entre 35 et 43 kDa (Kino et al., 2004). Des formes tronquées ont également été décrites par Kino et collaborateurs (Kino et al., 2004). Cependant, nous ne les détaillerons pas dans la mesure où leur expression protéique n'a pas été démontrée.

Les différentes protéines isoformes MBNL1 diffèrent par la présence ou pas des exons alternatifs 3, 5, 7 et 9. La région codée par l'exon 3 semble jouer un rôle primordial dans la liaison de MBNL1 aux ARN (Kino et al., 2004). En effet, l'analyse de la séquence primaire de MBNL1 révèle la présence d'un domaine de liaison aux ARN caractérisé par 4 motifs à doigts de zinc (ZnF) très conservés de type CCCH codés par les exons 1, 2 et 4 (Fardaei et al., 2002; Kino et al., 2004; Miller et al., 2000; Teplova and Patel, 2008). La région codée par l'exon 3 est localisée entre les motifs ZnF2 et ZnF3 et jouerait le rôle d'espaceur (Figure 13 et Figure 14). Sa présence

favoriserait l'affinité de liaison de MBNL1 aux ARN (Kino et al., 2004). La région codée par l'exon 5 semble impliquée dans la localisation subcellulaire de MBNL1. En effet, plusieurs études ont montré que les isoformes incluant l'exon 5 de MBNL1 étaient localisées dans le noyau exclusivement (Lin et al., 2006; Terenzi and Ladd, 2010). Plus récemment, un nouveau motif d'adressage nucléaire (motif KRAEK) a été mis en évidence au sein de l'exon 5 de MBNL1 (Figure 14). Lorsque ce motif est muté, la protéine n'est plus localisée exclusivement dans le noyau. De plus lorsqu'il est fusionné à une protéine rapportrice (la beta-galactosidase), celle-ci est relocalisée dans le noyau exclusivement (Fernandez-Costa and Artero, 2010). Enfin, aucune fonction précise n'a été associée aux régions codées par les exons alternatifs 7 et 9 de MBNL1.

```

MAVSVTPIRDTKWLTLEVCREFQRGTCSRPDTECKFAHPSKS
CQVENGRVIACFDSLKGRCSRENCKYLHPPPHLKTQLEINGR
NNLIQQKNMAMLAQQMQLANAMPGAPLQPVPMFSVAPSL
ATNASAAAFNPYLGVPSPSLVPAEILPTAPMLVTGNPGVP
VPAAAAAAAQKLMRTDRLEVCREYQRGNCNRGENDCRFA
HPADSTMIDTNDNTVTVCMDYIKGRCSREKCKYFHPPAHL
QAKIKAAQYQVNQAAAAQAAATAAAMTQSAVKSLKRPLE
ATFDLGIPQAVLPPLPKRPALEKTNGATAVFNTGIFQYQQAL
ANMQLQQHTAFLPPGSILCMT PATSVVPMVHGATPATVSA
ATTSATSVPFAATATANQIPIISA EHLTSHKYVTQM

```

Figure 14. Structure primaire de l'isoforme MBNL1 incluant tous les exons alternatifs (isoforme 43). Les exons alternatifs 3, 5 et 7 sont représentés en gras soulignés. Les séquences correspondant aux motifs à doigts de zinc ZnF1, ZnF2, ZnF3 et ZnF4 sont surlignés en gris. Le motif d'adressage nucléaire identifié par Fernandez-Costa est surligné en jaune.

De manière générale, MBNL1 est décrit principalement comme étant **un facteur d'épissage** (Ho et al., 2004) se liant à des motifs YGCY (où Y est une pyrimidine) (Goers et al., 2010; Ho et al., 2004) présents sur de l'ARN double-brin (Miller et al., 2000, Warf and Berglund, 2007). D'après Warf et Berglund, la liaison de MBNL1 aux motifs YGCY présents sur l'ARN double-brin favoriserait et stabiliserait la structure secondaire de type tige boucle adoptée par le transcrit cible (Warf and Berglund, 2007). Selon la position de ce site de liaison par rapport à l'exon alternatif, MBNL1 favoriserait ou au contraire inhiberait l'inclusion de l'exon alternatif (Goers et al., 2010). Ainsi, la liaison de MBNL1 en 5' de l'exon alternatif empêcherait la reconnaissance du site d'épissage 3' par le complexe d'épissage conduisant ainsi à son exclusion

(Warf et al., 2009) alors que celle en 3' de l'exon alternatif la favoriserait conduisant donc à l'inclusion de l'exon alternatif (Goers et al., 2010) comme illustré à la figure 15.

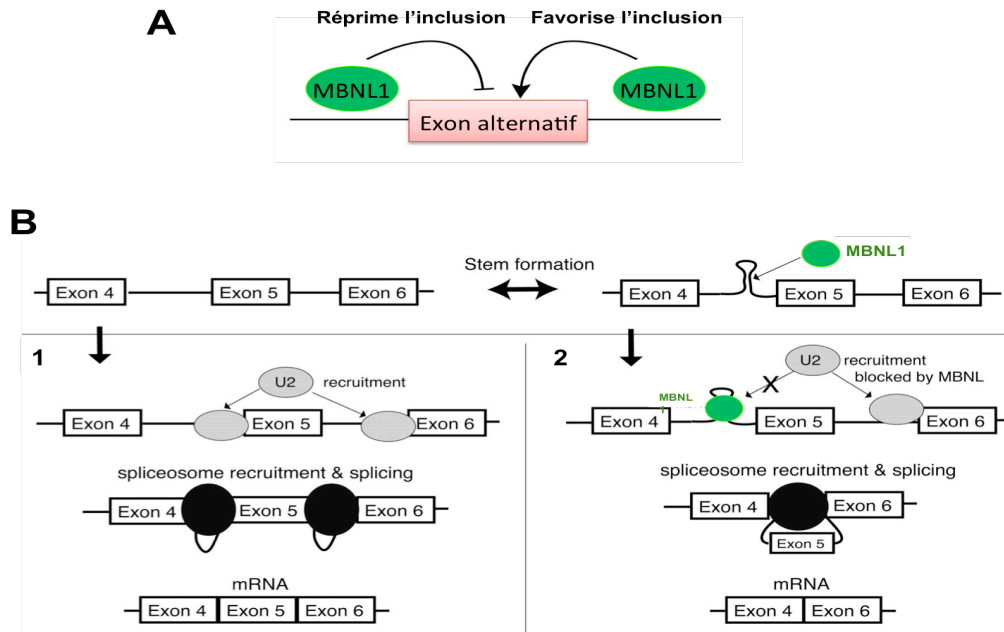


Figure 15. Mécanisme d'action de MBNL1. A Effet de MBNL1 selon la localisation de ses sites de liaisons. Lorsque les sites de fixation de MBNL1 sont localisés en 5' de l'exon alternatif, MBNL1 réprime l'inclusion de l'exon alternatif. Lorsque les sites sont localisés en 3', MBNL1 favorise l'inclusion de l'exon alternatif. Schéma d'après Goers et al., 2010. B Modèle d'action de la répression de l'inclusion de l'exon 5 de la troponine T cardiaque (cTNT). (1) En l'absence de MBNL1, l'intron 4 forme une structure secondaire instable permettant l'accès et la reconnaissance du site d'épissage 3' par le petit ARN U2 du complexe d'épissage. L'exon 5 de cTNT est inclus. (2) En présence de MBNL1, MBNL1 se lie à la structure secondaire de type tige boucle et la stabilise. Le site d'épissage 3' n'est plus accessible au petit ARN U2. L'exon 5 est exclu. Schéma d'après Warf and Berglund, 2007

Parmi les transcrits connus pour être régulés directement par MBNL1, on peut citer l'exon 5 de la troponine T cardiaque ainsi que l'exon 11 du récepteur à l'insuline (Ho et al., 2004). Cependant, des nouvelles études de séquençage à haut débit révèlent un nombre croissant de transcrits dont l'épissage alternatif est régulé par MBNL1 (Du et al., 2010 ; Kalsotra et al., 2008). De plus, il est intéressant de noter que les motifs liant MBNL1 sont particulièrement enrichis au sein des transcrits exprimés dans le tissu cérébral principalement puis dans le tissu cardiaque et musculaire (Castle et al., 2008).

III. IMPLICATION DE MBNL1 DANS LA DM1

III. A Co-localisation de MBNL1 avec les expansions CUG

Comme nous venons de le voir, les protéines MBNL possèdent des domaines de liaison aux motifs YGCY présents sur les ARN double-brin. L'intérêt porté aux protéines MBNL vient de leur capacité à se fixer à ces motifs et plus particulièrement aux expansions CUG exprimées dans la DM1 (Fardaei et al., 2002). Ainsi, MBNL1 a été la première protéine identifiée, capable de se fixer *in vitro* spécifiquement aux motifs CUG (Miller, 2000). Cette étude *in vitro* fut ensuite validée par hybridation *in situ* dans des cellules musculaires et neuronales issues de patients DM1 comme illustré sur la figure 16 (Fardaei et al., 2001; Jiang et al., 2004; Mankodi et al., 2001) et étendue à MBNL2 et MBNL3 (Fardaei et al., 2002).

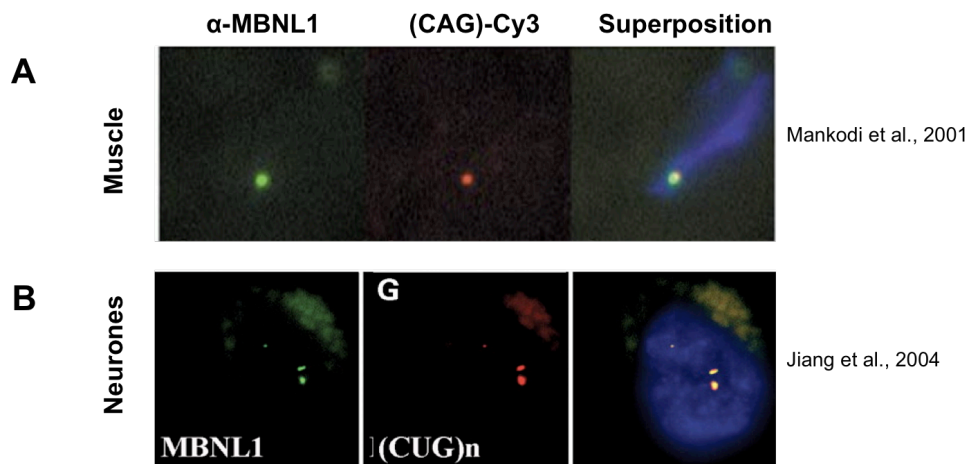


Figure 16. Co-localisation de MBNL1 avec les expansions CUG. MBNL1 est marquée par immunofluorescence en vert grâce à un anticorps dirigé contre MBNL1 spécifiquement. Les expansions sont visualisées en rouge par FISH (hybridation *in situ* fluorescente) après hybridation avec une sonde CAG-CY3. **(A)** Marquage réalisé à partir de tissu musculaire. D'après Mankodi et al., 2001. **(B)** Marquage réalisé à partir de neurones de sections du cortex frontal ou temporal. D'après Jiang et al., 2004

La liaison de MBNL1 aux expansions CUG implique le domaine amino-terminal de la protéine incluant les quatre domaines à doigts de zinc (Yuan et al., 2007). Des études *in vitro* révèlent que le domaine carboxy-terminal de la protéine serait impliqué dans la dimérisation de la protéine (Yuan et al., 2007). Ces résultats suggèrent donc que MBNL1 serait séquestrée directement aux expansions CUG *via* son domaine amino-terminal ou indirectement *via* son domaine carboxy-terminal.

Au plus les expansions sont grandes, au plus MBNL1 s'y lie (Miller et al., 2000), contribuant ainsi à augmenter leur stabilité (Houseley et al., 2005). En effet, lorsque l'expression

de MBNL1 est abolie, le nombre de *foci* est considérablement réduit (Dansithong et al., 2005). Cependant, il est à noter que la liaison de MBNL1 aux expansions CUG et donc les inclusions ribonucléoprotéiques ne sont pas toxiques en elles-mêmes, du moins chez la drosophile (Houseley et al., 2005). Il semblerait en effet que cela soit davantage la perte de fonction de MBNL1 qui soit impliquée dans la physiopathogenèse de la DM1.

III. B Perte de fonction de MBNL1

Plusieurs arguments vont en faveur d'un rôle de MBNL1 dans le développement de la DM1. Tout d'abord, MBNL1 est un facteur d'épissage (Ho et al., 2004) impliqué dans la régulation de l'épissage alternatif de nombreux transcrits parmi lesquels deux d'entre eux (cTNT et IR) sont dérégulés dans la DM1 (Philips et al., 1998; Savkur et al., 2001). Ensuite, comme nous venons de le voir, MBNL1 co-localise avec les expansions CUG dans le muscle et les neurones issus de patients DM1 (Mankodi, 2001 ; Jiang, 2004). La localisation de MBNL1 aux *foci* sous forme d'inclusions nucléaires entraînent sa déplétion au sein du nucléoplasme et donc son indisponibilité à réguler l'épissage alternatif de ses transcrits cibles. Afin de mimer cette perte de fonction, un modèle de souris transgénique *knock-out* (KO) pour *MBNL1* exon 3 a été généré et a permis d'étudier les conséquences de la perte de fonction de MBNL1 (Kanadia et al., 2003a). D'un point de vue phénotypique, les souris KO *mbnl1* présentent plusieurs symptômes similaires à ceux observés chez les patients DM1 tels que la myotonie et une cataracte. D'un point de vue moléculaire, un changement de l'épissage alternatif des transcrits CLCN1, TNNT3, cTNT et IR similaires à celui décrit chez les patients DM1 a également été observé. Ainsi, la génération de ce modèle de souris transgénique a permis de confirmer le rôle essentiel de MBNL1 dans la physiopathologie de la DM1. De plus, la surexpression de MBNL1 dans le modèle de souris DM1 HSA^{LR} exprimant les expansions CUG montre que le phénotype pathologique ainsi que les changements d'épissage de ces souris peuvent être restaurés par MBNL1 (Kanadia et al., 2006).

Enfin, plus récemment, afin d'évaluer l'implication de la perte de fonction de MBNL1 dans le phénotype DM1, des études menées par Osborne et collaborateurs en 2009 et Du et collaborateurs en 2010 ont comparé les changements d'épissage observés dans le muscle squelettique de souris KO *mbnl1* et de souris HSA^{LR} et ont montré que la perte de fonction de MBNL1 expliquerait 80% des changements d'épissage observés chez la souris HSA^{LR} (Osborne et al., 2009 ; Du et al., 2010) suggérant ainsi qu'une thérapie impliquant MBNL1 pourrait potentiellement être envisageable.

OBJECTIFS

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est une maladie affectant de nombreux organes parmi lesquels le cerveau. Ainsi, outre les symptômes liés à l'atteinte musculaire, certains patients DM1 présentent également une atteinte cérébrale qui se manifeste par un retard mental et des troubles cognitifs. Sur le plan histologique, on observe des agrégats Tau caractéristiques d'une **dégénérescence neurofibrillaire** (Vermersch et al., 1996). Sur le plan moléculaire, l'analyse des transcrits révèle **un changement de l'épissage alternatif des exons 2 et 3 de Tau**, au profit de la surexpression de l'isoforme fœtale (Sergeant et al., 2001). Le profil d'épissage de type fœtal observé de Tau dans la DM1, est une caractéristique commune à plusieurs transcrits, observée dans le cœur, le muscle squelettique et le cerveau. Dans le cerveau, Tau n'est pas le seul transcrit dérégulé. Un changement d'épissage des transcrits APP, NMDAR-1 et MBNL1 a également été observé (Jianget al., 2004; Dhaenens et al, 2008) . Cette observation suggère l'implication d'un ou de plusieurs mécanismes communs.

La DM1 est une maladie à gain de fonction toxique des ARN mutés. En effet, les transcrits mutés CUG forment des inclusions ribonucléoprotéiques au sein desquelles est séquestré le facteur d'épissage MBNL1. Sa subséquente perte de fonction entraîne une dérégulation de l'épissage alternatif de nombreux transcrits. D'autres facteurs d'épissage dont ceux de la famille CELF ont également été impliqués dans la DM1. Il a en effet été montré que le facteur d'épissage CUG-BP1 (CELF1) était anormalement phosphorylé dans le tissu cardiaque DM1, ce qui inhiberait sa dégradation et augmenterait donc son activité.

L'objectif général de mes travaux de thèse vise à **comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le défaut d'épissage de Tau** observé dans la DM1 et plus particulièrement **d'étudier le rôle du facteur d'épissage MBNL1** en tant que facteur d'épissage potentiellement impliqué dans la dérégulation de l'épissage alternatif de Tau.

MBNL1 est un facteur d'épissage principalement décrit dans le muscle. Afin de déterminer si les mécanismes moléculaires responsables des défauts d'épissage dans le cerveau sont similaires à ceux décrits dans le muscle, nous avons étudié le rôle de MBNL1 sur la régulation de l'épissage alternatif de Tau. Préalablement initiée avant mon arrivée en thèse par le laboratoire, la caractérisation de **l'expression de MBNL1 dans le tissu cérébral de patients DM1**, représente le point de départ de mon travail de thèse. Ce travail a permis de révéler au niveau du cerveau, un changement d'épissage de MBNL1 lui-même et des exons 2 et 3 de Tau. Nous avons ainsi pu montrer que le changement d'épissage de MBNL1 tout comme celui de Tau pouvait être reproduit dans un modèle cellulaire en présence de 960 triplets CTG. La lignée cellulaire utilisée (HeLa) présente l'intérêt d'avoir un profil d'épissage de Tau et de MBNL1

similaire à celui retrouvé dans le cerveau adulte sain contrairement à la lignée de type neuronal SY5Y qui reproduit un épissage de type foetal. Ce travail a mené à la publication suivante :

Dhaenens CM, Schraen-Maschke S, [Tran H](#), Vingtdeux V, Ghanem D, Leroy O, Delplanque J, Vanbrussel E, Delacourte A, Vermersh P, Maurage CA, Gruffat H, Sergeant A, Mahadevan MS, Ishiura S, Buee L, Cooper TA, Caillet-Boudin ML, Charlet N, Sablonniere B, Sergeant N.

Overexpression of MBNL1 fetal isoform and modified splicing of Tau in DM1 brain: two individual consequences of CUG trinucleotide repeats. *Exp. Neurol.* 210, 467-478, 2008

Etant donné le rôle central de MBNL1 dans la physiopathologie de la DM1, une partie de mes travaux de thèse s'est focalisée sur les conséquences du changement d'épissage de MBNL1. Ainsi, une étude visant à **comprendre les différences fonctionnelles entre les isoformes de MBNL1** a été menée en collaboration avec les équipes de Christiane Branlant à Nancy, Denis Furling à Paris et Nicolas Charlet à Strasbourg. Nous avons ainsi pu montrer que le défaut d'épissage de MBNL1 favorise l'expression des isoformes de MBNL1 exclusivement nucléaires, avec un potentiel accru pour l'oligomérisation. Ce travail de collaboration a fait l'objet du manuscrit suivante soumis dans la revue *Journal of Biochemistry* et est présentée ici sous forme de publication:

[Tran H](#), Gourrier H, Lemercier C, Dhaenens CM, Vautrin A, Carpentier C, Obriot H, Fernandez-Gomez F, Eddarkaoui S, Delattre L, Van Brussels E, Sablonnière B, Buée L, Charlet-Berguerand N, Furling D, Schraen-Maschke S, Behm-Ansant I, Branlant C, Caillet-Boudin ML, Sergeant N

Structure-function analysis of MBNL1 isoforms precises the regions involved in nuclear localization, splicing activity and oligomerization

La séquestration de MBNL1 est une des conséquences du gain de fonction toxique des ARNs mutés dans la DM1. Basé sur ces données et sur les résultats obtenus dans notre étude de structure-fonction de MBNL1, nous avons voulu déterminer **(1) si la surexpression de MBNL1 pouvait restaurer un épissage normal, si (2) l'effet était isoforme-dépendant et (3) caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu**. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Denis Furling (Camille Lemercier) pour l'étude dans les cellules musculaires. Ce travail est présenté ici sous forme d'un manuscrit en cours de préparation :

[Tran H](#), Lemercier C, Dhaenens CM, Carpentier C, Van Brussels E, Obriot H, Fernandez-Gomez F, Eddarkaoui S, Sablonnière B, Buée L, Charlet-Berguerand N, Schraen-Maschke S, Caillet-Boudin ML, Furling D, Sergeant N

MBNL1 RNA binding domain is sufficient to reverse splicing defects associated with myotonic dystrophy type 1

Enfin, parallèlement à l'étude du rôle de MBNL1 sur l'épissage alternatif des exons 2 et 3 de Tau, nous avons également **étudié le changement d'épissage de l'exon 10 de Tau dans le tissu cérébral DM1**. Une collaboration avec le Dr A Lopez de Munain nous a permis d'étendre notre étude sur un plus grand nombre d'échantillons humain et de caractériser le changement d'épissage de l'exon 10 de Tau. Nous avons pu montrer que les mécanismes de dérégulation de l'épissage des exons 2, 3 et 10 de Tau n'étaient pas rigoureusement identiques. Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise à *BBA Molecular Basis of Diseases* en cours de révision :

Dhaenens C.M, Tran H, Frandemiche M.-L, Schraen-Maschke S, Sistiaga A, Goicoechea M, Carpentier, C, Eddarkaoui, S, Van Brussels E, Obriot H, Gevaert, M.H, Fernandez-Gomez, F, Charlet-Berguerand N, Deramcourt V, Maurage, C.A, Buée, L, Lopez de Munain, A, Sablonnière, B, Caillet-Boudin, M.L, Sergeant N

Myotonic dystrophy type 1 mis-splicing pattern of Tau exon 10 is reproduced by overexpression of ETR-3 but not MBNL1 silencing

RESULTATS

I. Implication du facteur d'épissage MBNL1 dans la régulation de l'épissage alternatif des exons 2 et 3 de Tau dans la DM1

I. A Contexte de l'étude

La présence de protéines Tau agrégées sous forme de DNF avait été précédemment mise en évidence dans le cerveau de patients atteints de DM1 (Vermersch et al., 1996). Le profil d'agrégation de Tau dans la DM1 diffère de celui des autres maladies neurodégénératives où Tau est également retrouvée agrégée dans la mesure où l'isoforme fœtale (isoforme dépourvue des exons 2, 3 et 10), est très majoritairement constitutive des agrégats Tau. En effet, un marquage réalisé avec un anticorps dirigé contre les formes de Tau hyper phosphorylées (AD2) révèle la présence d'une bande principale à 55kDa (Vermersch et al., 1996). Le marquage par immunohistochimie des agrégats grâce à des anticorps dirigés contre les séquences codées par les exons 2 ou 10 révèle l'absence d'isoformes incluant ces exons alternatifs au sein des agrégats Tau. Ainsi, le profil d'agrégation particulier observé dans la DM1 fut associé à un changement d'épissage des exons 2 et 3 du transcrite Tau (Sergeant et al., 2001). En 2004, Jiang et collaborateurs confirmèrent ce changement d'épissage et montrèrent la présence d'agrégats ribonucléoprotéiques dans les neurones de patients DM1. Ces agrégats sont composés de répétitions CUG avec lesquelles colocalise le facteur d'épissage MBNL1 (Jiang et al., 2004). La même année, Ho et collaborateurs démontrèrent que la perte de fonction de MBNL1 pouvait reproduire des changements d'épissage similaires à ceux observés dans la DM1 (Ho et al., 2004).

I. B Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence le rôle du facteur d'épissage MBNL1 dans la dérégulation de l'épissage des exons 2 et 3 de Tau dans la DM1.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression des transcrits et des protéines MBNL1 dans le cerveau des patients DM1 préalablement caractérisés pour leurs changements d'épissage des exons 2 et 3 de Tau (Sergeant et al., 2001).

Dans un second temps, nous avons voulu déterminer si ces deux changements d'épissage étaient bien liés à l'expression de la mutation DMI. Pour cela, nous avons reproduit la surexpression de répétitions CTG par transfection transitoire d'un plasmide porteur de 960 triplets CTG dans la lignée cellulaire HeLa et étudié leurs effets sur l'épissage alternatif des transcrits Tau et MBNL1.

Enfin, la régulation de l'épissage des exons 2 et 3 de Tau par MBNL1 a été testée par surexpression des différentes isoformes de MBNL1 et leur inhibition d'expression par ARN interférence.

I. C Résultats

Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article suivant paru dans *Experimental Neurology* en 2008. Brièvement, nous montrons que le changement d'épissage des exons 2 et 3 de Tau, similaire à celui observé dans le cerveau DM1, peut être reproduit (1) en présence des répétitions CUG et (2) par l'inhibition de l'expression de MBNL1 par ARN interférents. De façon intéressante, nous montrons également que l'épissage alternatif de MBNL1 (exons 5 et 7) est dérégulé dans le cerveau. Cependant, la surexpression de MBNL1 (toutes isoformes confondues) ne modifie pas l'épissage alternatif de Tau, indiquant donc que ces deux phénomènes sont indépendants l'un de l'autre. Au total, ces résultats démontrent que le changement d'épissage des exons 2 et 3 de Tau est dû aux expansions triplets qui séquestrent le facteur d'épissage MBNL1. Sa subséquente perte de fonction favorise l'exclusion des exons 2 et 3 de Tau.

II. Etude de la relation structure/fonction de MBNL1 : Conséquences du changement d'épissage de MBNL1 dans la DM1

II. A Contexte de l'étude

MBNL1 est un facteur d'épissage jouant un rôle essentiel dans la physiopathologie de la DM1 (Kanadia et al., 2003) . Le gène *MBNL1* contient 12 exons dont 10 codants. L'épissage alternatif des cassettes 3, 5 et 7 génère une combinaison d'au moins 10 isoformes (Fardaei et al., 2001).

Dans le but initial d'étudier le rôle de MBNL1 sur la régulation de l'épissage alternatif des exons 2 et 3 de Tau, nous avons mis en évidence, dans le cerveau adulte de patients atteints de DM1, une dérégulation de l'épissage des exons 5 et 7 de MBNL1 correspondant à une augmentation de leur inclusion (Dhaenens et al., 2008). Ce profil d'épissage pathologique correspond à celui observé dans le cerveau fœtal et est également retrouvé dans le muscle adulte DM1 (Lin et al., 2006). Bien que le changement d'épissage de MBNL1 semble être indépendant de celui des exons 2 et 3 de Tau (Dhaenens et al., 2008), ses conséquences sur la fonction de la protéine demeure encore non connues. Les conséquences fonctionnelles du changement d'épissage de MBNL1, aussi bien dans le cerveau que dans le muscle, ont donc été abordées par une étude de la relation structure-fonction.

II.B Objectifs

L'objectif de cette étude était de mieux **caractériser la fonction du facteur d'épissage de MBNL1 en fonction de sa structure primaire**. Nous nous sommes donc intéressés principalement au rôle des séquences codées par 3 des exons alternatifs de MBNL1.

MBNL1 est un facteur d'épissage dont l'activité dépend de sa localisation subcellulaire. Nous avons donc dans un premier temps étudié l'influence des domaines codés par les exons 3, 5 et 7 sur la localisation nucléaire de MBNL1 dans des myoblastes et dans des cellules HeLa. Puis nous avons corrélé cette localisation à sa fonction en tant que facteur d'épissage. Cependant, puisque la surexpression de MBNL1 ne modifie pas l'épissage alternatif des exons 2 et 3 de Tau, nous avons choisi d'utiliser d'étudier l'effet de MBNL1 sur l'épissage de deux autres transcrits connus pour être dérégulés dans la DM1 : celui de hcTNT et IR en utilisant comme outil des minigènes contenant l'exon 5 de la troponine T cardiaque et l'exon 11 du récepteur à l'insuline. Ces deux minigènes furent précédemment décrits (Ho et al., 2004). Toutes les isoformes de MBNL1 furent testées.

II. C Résultats

Ce travail fut réalisé en collaboration avec les équipes de Christiane Branlant et Isabelle Behm-Ansmant, à Nancy pour leur expertise dans le domaine des interactions ARN-protéines (Nathalier Gourrier, Audrey Vautrin) ; Denis Furling, à Paris pour leur expertise en culture primaire de cellules musculaires (Camille Lemercier) et Nicolas Charlet pour le transfert de technologie de clonage par Gateway et son aide en biologie moléculaire pour le sous-clonage des isoformes MBNL1. Les résultats de ce travail de collaboration sont présentés dans le manuscrit suivant soumis à la revue *Journal of Biochemistry*.

En résumé, cette étude a permis de montrer l'importance des séquences codées par les exons 3, 5 et 7 dans la fonction de MBNL1. L'exon 3 régule l'affinité de liaison de MBNL1 à ses séquences régulatrices. Cette propriété est très probablement associée à la fonction de facteur d'épissage de MBNL1. En effet, nous montrons qu'en l'absence de l'exon 3, MBNL1 modifie à peine l'épissage alternatif de ses transcrits cibles. L'exon 5 contrôle la localisation strictement nucléaire de la protéine, et l'exon 7 favorise l'oligomérisation de MBNL1. De façon intéressante, nous montrons également que le domaine codé par l'exon 6 interagit avec celui codé par l'exon 3 dans la régulation de la fonction de facteur d'épissage et avec celui de l'exon 5 dans la modulation de la localisation exclusivement nucléaire. Ces données suggèrent que le défaut d'épissage de MBNL1 observé dans la DM1 caractérisé par une augmentation de l'inclusion des exons 5 et 7 entraîne:

- une relocalisation nucléaire anormale de MBNL1,
- une oligomérisation accrue de MBNL1

Au total, ces deux phénomènes favorisent la séquestration de MBNL1 par les répétitions CUG en les relocalisant au noyau et en favorisant leur oligomérisation.

III. Le domaine de liaison aux ARNs de MBNL1 :

Un bon outil pour restaurer un épissage normal de Tau dans la DM1 ?

III. A Contexte de l'étude

Un nombre croissant d'études démontre le rôle primordial du facteur d'épissage MBNL1 dans la physiopathologie de la DM1. En effet, les expansions CUG confèreraient un gain de fonction toxique aux ARN mutés qui se caractériserait entre autres par la séquestration de MBNL1 sous forme d'inclusions nucléaires (Miller et al., 2000). L'implication de la perte de fonction de MBNL1 dans la DM1 a été confortée par la génération d'un modèle de souris transgéniques invalidées pour l'expression de MBNL1 reproduisant les principaux symptômes cliniques ainsi que les changements d'épissage observés dans la DM1 (Kanadia et al., 2003). Ainsi, la perte de fonction de MBNL1 serait à l'origine de plus de 80% des changements d'épissage observés dans la DM1 (Du et al., 2010) . Enfin, l'injection de MBNL1 dans le muscle dans un modèle transgénique murin porteur de la mutation DM1 montre que le phénotype pathologique de ces souris peut être inversé par la surexpression de MBNL1.

III. B Objectifs de l'étude

L'ensemble des études menées se sont focalisées sur les transcrits musculaires. Au laboratoire, nous avons précédemment démontré que l'épissage alternatif de Tau était dérégulé dans le cerveau et dans le muscle issus de patients DM1 (Sergeant et al., 2001; Leroy, 2006b). De plus, nous venons de montrer que la dérégulation de l'épissage alternatif de Tau pouvait être reproduite par l'inhibition de l'expression de MBNL1 suggérant le rôle essentiel de MBNL1 dans la dérégulation de l'épissage de Tau dans la DM1. L'objectif de notre étude était **d'évaluer si le changement d'épissage de Tau induit par les répétitions CUG pouvait être restauré par la surexpression de MBNL1**. MBNL1 est lui-même soumis à un épissage alternatif générant plus de 10 isoformes. Notre précédente étude structure/fonction précédente démontre que toutes n'ont pas la même fonction. Ainsi nous avons dans un premier temps voulu déterminer si toutes les isoformes de MBNL1 pouvaient restaurer un épissage normal de Tau. Nous avons ensuite voulu caractériser les mécanismes impliqués grâce à l'utilisation des outils moléculaires précédemment décrits.

III. C Résultats

Ce travail fut réalisé en collaboration avec l'équipe de Denis Furling, à Paris pour leur expertise en culture primaire de cellules musculaires (Camille Lemerrier). Les résultats de ce travail de collaboration sont présentés ici sous forme de manuscrit en préparation. Il est à noter qu'il s'agit d'une ébauche qui sera complétée par des expériences complémentaires.

Brièvement, nous montrons que le changement d'épissage des exons 2 et 3 de Tau peut être restauré par la surexpression de MBNL1. De façon intéressante, nous observons que cette restauration peut être induite par toutes les isoformes de MBNL1. Or, comme nous l'avons montré précédemment, les isoformes MBNL1 excluant l'exon 3 ne modifient que très faiblement l'épissage alternatif de leurs transcrits cibles. Ainsi, ces résultats suggèrent que la restauration de l'épissage alternatif de Tau serait plutôt liée à une saturation des sites de liaisons CUG qu'aux fonctions d'épissage de MBNL1. Cette hypothèse fut par la suite confirmée par la surexpression du domaine de liaison aux ARN de MBNL1 seul qui a perdu sa fonction de facteur d'épissage. Nous avons par la suite étendu notre étude à un modèle de cellules musculaires. Ainsi, nous montrons que le domaine de liaison aux ARN de MBNL1 restaure l'épissage alternatif de nombreux transcrits dont l'épissage alternatif est dérégulé dans la DM1. Nous envisageons par la suite d'étendre notre étude à des cultures primaires de neurones issus de souris mimant la pathologie DM1 en collaboration avec l'équipe de Geneviève Gourdon.

IV. Changement d'épissage de l'exon 10 de Tau dans la DM1

IV. A Contexte de l'étude

Les patients atteints de DM1 présentent, outre l'atteinte musculaire, une atteinte du système nerveux central. Cette dernière se caractérise par des troubles cognitifs et un retard mental. D'un point de vue histologique, la présence d'une dégénérescence neurofibrillaire a été mise en évidence dans les structures limbiques, incluant l'hippocampe ainsi que dans les cortex frontal et temporal. Cette DNF, localisée, dans des régions cérébrales précises, a été associée à un changement d'épissage alternatif des exons 2 et 3 de Tau mais pas du 10 (Sergeant et al., 2001). Quelques années plus tard, Jiang et collaborateurs confirment la dérégulation de l'épissage des exons 2 et 3 de Tau sur 7 échantillons issus de cerveau humain DM1. De plus, ils montrent également une dérégulation de l'épissage alternatif de l'exon 10 de Tau dans les mêmes régions cérébrales analysées par Sergeant et collaborateurs (Jiang et al., 2004). Ainsi, alors que le changement d'épissage des exons 2 et 3 a été observé dans tous les cas DM1 analysés, celui de l'exon 10 semble donc être moins systématique.

IV. B Objectifs de l'étude

L'objectif de l'étude était de mieux **comprendre la dérégulation de l'épissage alternatif de l'exon 10** de Tau dans la DM1. Une collaboration avec le Dr Alfredo Lupez de Munain nous a permis d'étendre notre étude des tissus cérébraux à deux nouveaux cas de DM1. Afin de caractériser ces deux nouveaux cas, nous avons dans un premier temps déterminé le nombre de répétitions CTG selon les différentes régions cérébrales. Puis, dans ces mêmes régions cérébrales, nous avons étudié la présence et la composition en isoformes des agrégats Tau pathologiques. Un changement de l'épissage alternatif de l'exon 10 de Tau fut observé dans l'ensemble des régions analysées. Les mécanismes moléculaires et plus particulièrement le rôle des différents facteurs d'épissage de la famille MBNL et CELF furent également étudiés par surexpression sur l'épissage de l'exon 10 de Tau.

IV. C Résultats

Les résultats de ce travail sont présentés dans le manuscrit suivant soumis à *BBA Molecular Basis of Diseases* et est actuellement en cours de révision.

Brièvement, l'analyse génétique de ces différents cas DM1 a montré que le nombre et la taille des allèles mutés étaient similaires à ceux décrits précédemment (Sergeant et al., 2001).

Une dégénérescence neurofibrillaire, caractéristique des Tauopathies a également été mise en évidence dans le cortex transentorhinal, la région hippocampique, l'insula et l'amygdale, La composition en isoformes de ces agrégats Tau était similaire à celle précédemment décrite : deux bandes furent détectées dans la région hippocampique et l'amygdale alors qu'une bande fut observée dans le cortex transentorhinal et l'insula. L'analyse des transcrits Tau révèle un changement de l'épissage alternatif des exons 2 et 3 dans toutes les régions cérébrales. De façon intéressante, nous montrons également que l'épissage alternatif de l'exon 10 de Tau était modifié dans ces nouveaux tissus cérébraux. Le rôle des différents facteurs d'épissage de la famille MBNL et CELF fut étudié et a démontré que les mécanismes moléculaires impliqués dans la dérégulation de l'épissage alternatif des exons 2 et 10 de Tau sont différents.

DISCUSSION

I. CHANGEMENT D'ÉPISSAGE DES EXONS 2, 3 ET 10 DE TAU DANS LA DM1

I. A Relation entre le changement d'épissage de Tau et la mutation DM1

Le laboratoire a précédemment montré que l'épissage alternatif des exons 2 et 3 de Tau était dérégulé dans la DM1 (Sergeant et al., 2001) . L'étude menée ici sur deux nouveaux cas DM1 d'origine espagnole confirme cette observation. Le changement d'épissage des exons 2 et 3 de Tau dans la DM1 est caractérisé par une baisse de leur inclusion. Il a été observé **dans toutes les régions cérébrales**, chez tous les patients analysés. De plus, il semble être relativement similaire d'une région à l'autre.

Afin d'établir une relation entre le changement d'épissage de Tau et la mutation DM1, nous avons déterminé le nombre et la taille des allèles mutés. De façon intéressante, l'analyse génétique montre que toutes les aires cérébrales sont polymorphes et possèdent une mosaïque de répétitions CTG dont la taille varie de 150 à plus de 2000. Le mosaïcisme est très variable d'une région à l'autre, tant au niveau du nombre d'allèles polymorphes qu'au niveau de la taille des répétitions, reflétant des phénomènes d'instabilité importants dans le cerveau. Ainsi, bien qu'il y ait une grande hétérogénéité entre les cas, nous avons observé de manière générale que la région limbique (hippocampe, insula et amygdale) et le lobe temporal étaient les régions où le nombre d'allèles et la taille des répétitions étaient les plus élevés comparativement aux lobes frontal, pariétal et occipital.

Dans la mesure où le changement d'épissage de Tau est observé dans toutes les aires et bien que chaque aire ne présente pas le même nombre d'allèles mutés et la même taille de répétitions, il est difficile d'établir une corrélation avec le changement d'épissage de Tau. Cependant, nos études menées dans les cellules HeLa pour lesquelles Tau présente un épissage similaire à celui observé dans un cerveau adulte, démontrent qu'en présence des expansions CTG, l'inclusion des exons 2 et 3 de Tau diminue, confirmant ainsi leur rôle pathologique sur la régulation de l'épissage alternatif de Tau.

Dans le cerveau adulte, le transcrit Tau contient trois exons alternatifs : les exons 2, 3 et 10. Il est à noter que contrairement au changement d'épissage observé pour les exons 2 et 3, aucune dérégulation de l'exon 10 n'a été observée sur les cinq premiers cas DM1 présentés dans (Sergeant et al., 2001). Or, notre étude menée sur les deux nouveaux cas DM1 montre un changement de l'épissage alternatif de l'exon 10 caractérisé par une baisse de son inclusion. Ce dernier a également été rapporté dans une étude américaine menée sur sept échantillons de cerveaux DM1 (Jiang et al., 2004) et a été reproduit ici par une étude *in vitro* dans plusieurs lignées cellulaires. Ainsi, contrairement au changement d'épissage des exons 2 et 3 de Tau, celui de l'exon 10 semble être atypique dans la mesure où il n'a pas été observé dans tous les cas

étudiés. L'analyse comparative entre l'anomalie génétique et le changement d'épissage de l'exon 10 révèle qu'il n'y a très probablement aucune corrélation. En effet, que le patient soit atteint de la forme congénitale (CTG_{n>1000}) ou de la forme adulte classique (CTG_{n>150}), aucun changement de l'épissage alternatif de l'exon 10 n'a pu être observé (Sergeant et al., 2001). Dans notre étude, les cas DM1 présentant un changement de d'épissage de l'exon 10 étaient tous deux atteints de la forme adulte classique DM1, caractérisée par un nombre de répétitions modéré. Enfin, il est important de souligner que les techniques de prélèvement, le délai post-mortem, la qualité des échantillons ainsi que les méthodes d'études étaient sensiblement similaires. Dans la mesure où les patients étaient d'origines différentes d'une étude à l'autre, nous suggérons que la différence observée serait possiblement plurifactorielles, liée à d'autres facteurs génétiques et/ou à une ou plusieurs composantes environnementales. En effet, les patients issus de l'étude de Sergeant et al étaient d'origine du Nord de la France alors que ceux présentés dans ce manuscrit provenaient du Pays Basque, région où l'incidence de la DM1 est particulièrement élevée.

I. B Le changement d'épissage dans la DM1 apparaît comme un épissage de type fœtal

Le profil d'épissage de Tau observé dans les cerveaux adultes DM1 est similaire à celui observé dans un cerveau de fœtus humain sain. Il correspond à l'expression de l'isoforme la plus courte (exclusion des exons 2, 3 et 10) principalement. Tau n'est pas le seul transcrite à être modifié dans le cerveau DM1. En effet, nous avons montré que l'épissage de MBNL1 était modifié dans le cerveau adulte DM1, de façon similaire à celui observé au stade fœtal. De même, comme il l'a été précédemment décrit par (Jiang et al., 2004), nous avons également observé un profil d'épissage de type fœtal du transcrite NMDA-R1. Ainsi, l'ensemble de ces données suggère une **réactivation d'un programme d'épissage de type fœtal** affectant plusieurs transcrits dont Tau. Cependant, nous pourrions également suggérer que ce phénotype résulte de la dérégulation de facteurs qui ne sont pas nécessairement impliqués dans la transition de l'épissage fœtal vers un épissage de type adulte.

II. MECANISMES IMPLIQUES DANS LE CHANGEMENT D'ÉPISSAGE DES TRANSCRITS TAU

II. A L'hypothèse de la réactivation d'un programme d'épissage de type fœtal

La dérégulation du programme d'épissage pourrait correspondre à une dérégulation de l'expression/activité d'un ensemble de facteurs d'épissages exprimés au stade fœtal ou adulte. Parmi eux, il a été montré dans le tissu cardiaque de souris sauvage, que l'expression de CELF 1 était plus importante dans le cœur fœtal que dans le cœur adulte, et que l'expression de MBNL1

était au contraire, plus faible au stade fœtal qu'à l'âge adulte (Kalsotra et al., 2008) . Ainsi, le changement d'expressions CELF1/MBNL1 pourrait être corrélé à la transition « épissage fœtal - épissage adulte » observée après la naissance (Kalsotra et al., 2008). Il semble en effet exister une balance quantitative et qualitative bien régulée entre ces deux facteurs, dont l'action est antagoniste sur un grand nombre de transcrits communs. Or, nous avons observé que deux protéines de la famille CELF (CELF1 et CELF2) étaient anormalement surexprimées dans le cerveau adulte DM1. De même, il est intéressant de souligner qu'une des caractéristiques majeure de la DM1 correspond à la perte de fonction de MBNL1 par sa séquestration dans les *foci*. Ainsi, ces observations décrites dans le cœur en développement pourraient être comparées à celles observées dans le cerveau DM1, où le défaut d'épissage de Tau serait la conséquence d'une **réactivation du programme d'épissage de type fœtal impliquant les protéines CELF1 et MBNL1**. Nous avons, dans un travail très préliminaires et *in vitro*, envisagé ce paradigme en comparant l'épissage alternatif de Tau en présence ou pas des expansions CTG dans deux lignées cellulaires présentant pour l'une, un profil d'épissage de type fœtal et pour l'autre, celui de type adulte. Cependant, nos résultats démontrent que les mécanismes de régulation de l'épissage de Tau impliqués dans la DM1 pourraient être différents de ceux observés au stade fœtal (Ghanem et al., 2009). Ceux-ci seraient en accord avec le fait que certains changements d'épissages alternatifs induits par les CTG ne sont pas reproduits dans des souris surexprimant CELF1, ni dans des souris invalidées pour MBNL1 (Du et al., 2010) suggérant l'implication d'éventuels autres facteurs. Cependant, l'implication de CELF1 et MBNL1 dans la dérégulation de l'épissage alternatif de Tau a été poursuivie étant donné leurs rôles clés dans la physiopathologie de la DM1. De même, l'implication d'autres protéines de la famille CELF, tels que CELF2 et CELF4 a été envisagée puisqu'elles ont été décrites comme protéines régulatrices de l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 de Tau (Leroy et al., 2006a; Gao et al., 2000; Li et al., 2003 ; Chapple et al., 2007) .

II. B Rôles des protéines CELF

Le changement d'épissage de l'exon 10 de Tau n'est pas systématique, contrairement à celui des exons 2 et 3. Ainsi, il est probable que les mécanismes impliqués dans la dérégulation de l'exon 10 soient différents de ceux régulant l'épissage des exons 2 et 3. De façon intéressante, nous avons observé que la différence du profil d'épissage de l'exon 10 de Tau était associé à une augmentation de l'expression de CELF1 et CELF2. Ce changement d'expression a également été observé dans le muscle de patients DM1 (Savkur et al., 2001) . De plus, la surexpression de CELF1 dans le muscle ou dans le cœur suffit à reproduire une partie des symptômes et des changements d'épissage similaires à ceux observés chez les patients DM1 (Ho et al., 2005; Koshelev et al., 2010; Ward et al., 2010). Très peu d'études jusqu'à présent se sont intéressées à

leurs rôles dans le cerveau. CELF2 est exprimée dans le cerveau et réprime l'inclusion de l'exon 2 de Tau (Leroy et al., 2006a). Nous montrons ici, qu'il réprime également celle de l'exon 10. En revanche, ni la surexpression ni l'inhibition d'expression de CELF1 ne module l'épissage alternatif des exons 2 et 10 de Tau. Ainsi, **le changement d'épissage de l'exon 10 de Tau pourrait être en partie corrélé à l'augmentation d'expression de CELF2 et non de celle de CELF1 dans le cerveau.** L'augmentation d'expression de CELF1 dans le muscle a été associée à une augmentation de sa phosphorylation via l'activation de la voie PKC (Kuyumcu-Martinez et al., 2007). Or, comme CELF1 est très homologue à CELF2, il serait intéressant d'étudier le niveau de phosphorylation de CELF2 dans le cerveau également. En effet, comme nous l'avons précédemment décrit, la phosphorylation est une modification post-traductionnelle majeure impliquée dans la régulation de l'activité de nombreux facteurs d'épissage. Ainsi, il n'est pas à exclure que CELF2 soit anormalement phosphorylé dans les cerveaux DM1, ce qui modifierait sa localisation subcellulaire et/ou favoriserait son activité en tant que facteur d'épissage et/ou encore augmenterait sa demi-vie. Cette étude pourrait également avoir une répercussion sur la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement d'autres Tauopathies de type sporadiques pour lesquelles il a été mis en évidence une dérégulation de la balance kinase/phosphatase associée un changement d'épissage des exons 2, 3 ou 10 de Tau telle que la maladie d'Alzheimer précédemment développé dans l'introduction.

II. C Rôles des protéines MBNL1

II. C. 1 Dérégulation de l'épissage alternatif de MBNL1 dans la DM1

MBNL1 est un facteur d'épissage, lui-même soumis à un épissage alternatif générant plus de 10 isoformes. Nous montrons dans le cerveau adulte DM1 que l'épissage alternatif de MBNL1 est dérégulé. Ce changement d'épissage est également décrit dans le muscle adulte DM1 (Lin et al., 2006). Notre étude structure/fonction de MBNL1 montre que les différentes isoformes de MBNL1 ont des propriétés différentes quant à leur localisation subcellulaire, leur oligomérisation et leur fonction en tant que facteur d'épissage. Le profil d'épissage de MBNL1 observé dans la DM1 correspond à la surexpression de l'isoforme fœtale, incluant tous les exons alternatifs. Or nous montrons que cette isoforme (1) a une meilleure affinité de liaison à ses motifs ARN, (2) est localisée exclusivement dans le noyau et (3) se dimérise plus facilement que les autres isoformes. Ainsi, **le défaut d'épissage de MBNL1 observé dans le cerveau et le muscle DM1 pourrait contribuer à aggraver sa séquestration dans les *foci* nucléaires et donc sa perte de fonction et à *fortiori* à la sévérité du phénotype.**

II. C. 2 Perte de fonction de MBNL1 dans la DM1

La perte de fonction de MBNL1 dans la DM1 a été décrite et ses conséquences étudiées principalement dans le muscle sur des transcrits musculaires. Cependant, la DM1 est une pathologie affectant également le cerveau et peu d'études se sont intéressées à cet organe jusqu'à présent. MBNL1 est exprimé dans le cerveau et co-localise avec les répétitions CUG exprimées dans les neurones de patients DM1 (Jiang et al., 2004). De plus, une étude menée sur plus de 48 tissus a montré que l'incidence des motifs liant MBNL1 était particulièrement élevée dans le cerveau (Castle et al., 2008). Afin de mimer sa perte de fonction observée dans le cerveau DM1, nous avons inhibé son expression par technique d'ARN interférences et avons observé qu'elle reproduisait le changement d'épissage alternatif des exons 2 et 3 de Tau mais pas celui du 10. Or, une analyse plus approfondie *in silico* des séquences *cis*-régulatrices de Tau révèle la présence de plusieurs motifs MBNL1 à proximité des exons 2 et 3 mais aussi du 10 (Goers et al., 2010). Ainsi, la dérégulation de l'épissage de l'exon 10 de Tau observé dans la DM1 pourrait faire partie des 20% de transcrits dérégulés par la mutation mais pas par la perte de fonction de MBNL1 (Du et al., 2010).

II. C. 3 MBNL1 comme outil à visée thérapeutique ?

La perte de fonction de MBNL1 est systématique, alors que le gain de fonction des protéines de la famille CELF n'a pas toujours été observé dans les cerveaux DM1. De plus, nous observons *in vitro* que le changement d'épissage de Tau en présence des répétitions CUG peut être restauré par la surexpression de MBNL1. Une approche à visée thérapeutique basée sur la surexpression de MBNL1 a été faite au niveau du muscle et du cœur. Cette approche semble applicable à Tau puisque toutes les isoformes de MBNL1 que nous avons testés restaurent un épissage normal de Tau en présence des répétitions CUG.

Cependant, l'approche à visée thérapeutique basée sur la surexpression de MBNL1 présente ses limites. (1) Des expériences préliminaires dans notre modèle cellulaire suggèrent que **MBNL1 est toxique** pour la cellule. Des expériences préliminaires suggèrent que cette toxicité serait liée au domaine carboxy-terminal de la protéine qui surexprimé seul présente une toxicité comparable à celle observée pour MBNL1. (2) Comme nous l'avons démontré dans ce manuscrit, MBNL1 interagit avec lui même via son domaine carboxy-terminal, suggérant que cette région pourrait interagir avec d'autres protéines également. En présence des répétitions CUG, MBNL1 est séquestré dans les *foci*. Or si MBNL1 interagit avec d'autres protéines, cette séquestration pourrait conduire à la perte de fonction d'autres protéines. Ainsi, il a été montré que le facteur d'épissage hnRNP H était également séquestré par les *foci* via MBNL1 (Paul et al.,

2006). (3) MBNL1 est un facteur d'épissage, régulant l'épissage alternatif de nombreux transcrits dont le sien (Ho et al., 2004; Kanadia et al., 2003; Du et al., 2010; Dhaenens, 2008). Or, surexprimer un facteur d'épissage fonctionnel tel que MBNL1 peut contribuer à perturber l'équilibre d'un « pool » de facteurs d'épissage, ce qui aurait pour conséquences d'interférer avec l'épissage de nombreux transcrits.

Des travaux très préliminaires montrent que le domaine de liaison aux ARN seul semble être moins toxique que MBNL1 entier et qu'il ne présente aucune toxicité comparée à son contrôle vecteur vide. De plus, notre étude de relation entre la structure et la fonction de MBNL1 montre que son domaine de liaison aux ARN seul perd sa fonction de facteur d'épissage à plus de 80% et ses propriétés d'oligomérisation. Enfin, dans une autre étude, nous montrons aussi que toutes les isoformes de MBNL1 restaurent un épissage normal de Tau en présence des répétitions CUG. Or, les petites isoformes ne modifient plus l'épissage alternatif de leurs transcrits cibles contrairement aux plus grandes. Ces résultats suggèrent donc que les mécanismes impliqués dans la restauration de l'épissage de Tau sont indépendants de la fonction de facteur d'épissage de MBNL1. Cependant, il est important de souligner que toutes conservent leur fonction de liaison aux ARN CUG, bien que la force de liaison soit moins forte pour les petites isoformes. De plus, l'expression du domaine de liaison aux ARN de MBNL1 ayant perdu sa fonction de facteur d'épissage suffit à restaurer un épissage normal de Tau. De même, nous montrons dans des myoblastes que l'expression stable par infection lentivirale ne modifie que très faiblement l'épissage alternatif de transcrits cibles de MBNL1, alors qu'elle restaure un épissage normal de ces mêmes transcrits dans des cellules musculaires issues de patients DM1. Ces résultats suggèrent donc que **la restauration d'un épissage normal en présence des répétitions CUG impliquerait une saturation des sites de liaison de MBNL1 aux motifs CUG**. Le domaine de liaison aux ARN de MBNL1 seul serait en compétition avec MBNL1 endogène pour la liaison aux motifs CUG et sa liaison à ces derniers libèreraient MBNL1 séquestrés aux *foci*. Ces résultats suggèrent donc que l'utilisation du domaine de liaison à l'ARN de MBNL1 seul semble plus appropriée que la protéine entière.

L'approche à visée thérapeutique basée sur la saturation des sites de liaisons de MBNL1 a également été étudiée par d'autres équipes. En effet, Arambula et collaborateurs ont, après avoir déterminé la structure des ARN CUG par cristallographie, créé chimiquement des molécules liant spécifiquement ces motifs, démontrant ainsi pour la première fois qu'il était possible d'empêcher la liaison de MBNL1 aux motifs CUG par compétition pharmacologique (Arambula et al., 2009). De même Warf et collaborateurs ont montré qu'une petite molécule, la pentamidine pouvait en se liant aux motifs CUG empêcher la séquestration de MBNL1 par les

répétitions CUG et restaurer un épissage normal de plusieurs transcrits (Warf et al., 2009b). Cette étude, renforce l'intérêt de l'approche visant à saturer les sites CUG de liaisons de MBNL1. De plus, cette molécule est connue et déjà utilisée en clinique. En effet, la pentamidine est une petite molécule administrée dans certains cas aux personnes atteintes du VIH. Cependant, la pentamidine présente l'inconvénient d'interagir de façon non spécifique avec de nombreuses autres séquences nucléotidiques. Ainsi, il a été démontré qu'elle pouvait également inhiber la traduction en se liant aux ARN de transfert (Sun et al., 2008) et inhiber la réplication de l'ADN en se liant aux petits sillons de l'ADN (Edwards et al., 1992). Notre étude utilise le domaine de liaison aux ARN de MBNL1. Bien que cela reste à démontrer, l'utilisation de notre construction devrait se montrer plus spécifique quand aux sites de liaisons, diminuant ainsi le risque de liaisons non spécifiques. De plus, une autre étude que nous souhaiterions confirmer montre que le domaine de liaison aux ARN seul a une meilleure affinité de liaison aux motifs CUG qu'aux motifs présents sur ses transcrits cibles (Kino et al., 2004). Au total, nos résultats montrent que la saturation des motifs CUG dans des cellules exprimant les répétitions CUG ou dans des myoblastes DM1 suffit à restaurer un épissage normal de plusieurs transcrits dont l'épissage est modifié dans la DM1. Bien que l'outil créé remplisse cette fonction, nos résultats montrent que contrairement à d'autres approches, les *foci* restent présents. Or bien que la toxicité des inclusions nucléaires ne soit pas clairement établie, il n'est pas à exclure qu'ils puissent entraîner des changements de métabolisme au sein de la cellule. C'est pourquoi, d'autres approches basées sur le *trans*-splicing (Chen et al., 2009; Phylactou et al., 1998) ou la dégradation des motifs CUG présentent également tout leur intérêt. Les approches développées visant à dégrader les ARN mutés sont nombreuses et utilisent des ARN anti-sens, des ribozymes ou des shRNA (Mulders et al., 2009; Wheeler et al., 2009; Langlois et al., 2003; Langlois et al., 2005; Furling et al., 2003). Ainsi, si nous ne pouvons montrer l'innocuité des *foci* saturés avec notre construction, nous envisageons d'améliorer notre outil en y ajoutant un signal d'adressage à la voie du NMD (non sense mediated decay). Le NMD est un mécanisme de contrôle qualité des ARN messagers qui les dégrade lorsqu'ils sont défectueux et qui pourrait ainsi éliminer l'ARN DMPK muté. Nous avons également envisagé de faciliter l'exportation des ARN à l'aide du domaine d'exportation nucléaire d'une protéine du VIH (REV) (Fischer et al., 1995). Il est fort possible que ce motif ne soit pas optimal et une étude récente propose des séquences de domaine d'exportation optimisé (Guttler et al., 2010). Il existe donc plusieurs approches possible pour contrecarrer l'effet *trans*-dominant des répétitions CUG. Cependant, il restera à restituer une expression normale de la DMPK.

Enfin outre l'intérêt à visée thérapeutique, notre outil présente également l'intérêt de restaurer un épissage normal de Tau dans la DM1. La DM1 est une Tauopathie. Or, aucune

démonstration claire à ce jour n'a pu être apportée quant à l'impact du défaut d'épissage de Tau sur les fonctions normales du cerveau et le lien avec la pathologie Tau dans la DM1.

III. CONSEQUENCES DU CHANGEMENT D'ÉPISSAGE DES TRANSCRITS TAU : DEVELOPEMENT DE LA PATHOLOGIE TAU ?

III. A La DM1 est une Tauopathie

L'analyse histologique des cerveaux de patients atteints de DM1 révèle la présence d'une dégénérescence fibrillaire des neurones (DNF). Ces derniers ont été visualisés après marquage immunologique *via* des anticorps dirigés spécifiquement contre les protéines Tau pathologiques. Le profil biochimique des protéines Tau pathologiques observé dans la DM1 se distingue très clairement de celui observé dans d'autres Tauopathies telles que la maladie d'Alzheimer. Premièrement, pour une même quantité de protéines analysées dans une même région, on observe beaucoup plus de protéines Tau pathologiques marquées, dans la maladie d'Alzheimer que dans la DM1. Deuxièmement, le marquage observé pour les cerveaux DM1 après migration sur gel SDS-PAGE correspond à deux bandes de taille moléculaire apparente de 60 et 64 kDa, alors que celui décrit pour la maladie d'Alzheimer correspond à un quadruplet de taille moléculaire apparente de 60, 64, 69 et 74 kDa. Enfin l'analyse biochimique réalisée dans les différentes régions cérébrales révèle une distribution topographique spécifique. En effet, d'une façon générale, le marquage des protéines Tau pathologiques est observé principalement dans le système limbique incluant la formation hippocampique, l'insula et l'amygdale, et dans le lobe temporal. Ces régions sont également affectées au cours du vieillissement normal, à partir de 70-75 ans. Cependant, nous pouvons exclure l'implication du vieillissement puisque (1) certains cas présentant une DNF étaient âgés de moins de 50 ans et (2) la quantité de protéines Tau pathologique observée chez les patients DM1 était bien plus élevée que chez les personnes âgées. Il est intéressant de noter que l'atteinte du système limbique et celle du lobe temporal a également été observée chez les patients DM1 par techniques d'imagerie par résonance magnétiques (Romeo et al., 2010). Le système limbique correspond à la structure cérébrale associée aux processus gouvernant la mémoire des émotions de bases telles l'agressivité, la peur, la joie, la colère ou la tristesse. Or plusieurs études des fonctions psycho-cognitives menées sur des patients DM1 révèlent des troubles de reconnaissance des émotions faciales (telles que la peur, le dégoût et la colère) qui sont associées à des lésions du système limbique (Winblad et al., 2006; Takeda et al., 2009).

Comme nous l'avons développé précédemment, l'analyse génétique révèle un grand mosaïcisme des répétitions CTG entre les régions et au sein d'une même région cérébrale, où la région limbique (hippocampe, insula et amygdale) et le lobe temporal seraient les régions où la mutation serait la plus instable. De façon intéressante, nous observons que ces régions sont également celles qui présentent une pathologie Tau. Cependant, il est important de souligner qu'il s'agit ici d'un constat. En effet, **nous ne pouvons établir aucun lien de causalité, d'une part, car l'échantillonnage est faible et qu'il y a une variabilité interindividuelle, et d'autre part car nous ne pouvons pas déterminer si la pathologie Tau influence les mécanismes d'instabilités ou, si au contraire, l'instabilité, accrue dans ces régions, favorise son développement.** Les mécanismes liés à l'instabilité somatiques sont dus à des défauts du système de réplication et/ou de réparation de l'ADN (McMurray, 2010). Dans le cerveau, ils ont été décrits dans le neurone principalement (McMurray, 2010). Cependant, puisqu'il s'agit de cellules post-mitotiques, les défauts impliqués seraient davantage liés aux systèmes de réparation de l'ADN. Or, parmi les différentes hypothèses étiologiques, un défaut du système de réparation de l'ADN pourrait participer au développement des agrégats Tau, principalement suite à un stress oxydant. De même, il a été observé qu'au cours du vieillissement normal, le système de réparation de l'ADN devenait défectueux et que ce dernier pouvait être associé au développement d'agrégats Tau en quantité minime. Ainsi, la DM1 pourrait également présenter un intérêt, d'un point de vue fondamental, comme « maladie modèle » pour mieux comprendre la relation entre phénomène d'instabilité somatique/ système de réparation de l'ADN et pathologie Tau et déterminer si l'un peut influencer l'autre.

III.B Relations entre la pathologie Tau et le changement d'épissage de Tau

Ici, notre travail s'est principalement intéressé à étudier le changement d'épissage des exons 2, 3 et 10 de Tau dans la DM1. Comme nous venons de le discuter, la DM1 est une Tauopathie, caractérisée par des agrégats Tau dans le système limbique et dans le lobe temporal. Le profil biochimique des protéines Tau pathologique est caractéristique de la DM1 et reflète le changement d'épissage des exons 2, 3 et 10, faisant de la DM1 (avec la DM2) la seule Tauopathie décrite à ce jour comme présentant une pathologie Tau associée à un changement de l'épissage alternatif des exons 2 et 3. Ainsi, **existe-t-il un lien entre le changement d'épissage des exons 2, 3 et 10 et le développement de la pathologie Tau ?** Le changement d'épissage des exons 2 et 3 de Tau a été observé dans tous les cerveaux DM1 analysés alors que celui de l'exon 10 n'a été décrit que dans deux cas sur sept et semble beaucoup moins intense que celui des exons 2 et 3. Ainsi, nous focaliserons notre discussion sur les exons 2 et 3.

Le changement d'épissage des exons 2 et 3 de Tau a été décrit dans toutes les régions cérébrales. Le profil biochimique des protéines Tau « normales » reflète ce profil d'épissage et est identique dans toutes les régions corticales. En effet, en comparant le profil biochimique des protéines Tau « normales » entre cerveaux contrôles et cerveaux DM1, nous observons, de façon similaire à ce qui a été observé au niveau des ARN, un changement du *ratio* en protéines isoformes Tau 0N/1N/2N de 2/3/1 chez les contrôles à 4,5/1/0,5 chez les patients.

Les conséquences d'un changement de *ratio* en isoformes Tau ont principalement été étudiées pour les isoformes Tau 3R/4R. La balance Tau 3R/4R est essentielle au maintien de la structure microtubulaire et un déséquilibre de cette balance suffit à déstabiliser les microtubules et favoriser le développement de la pathologie Tau (Hutton et al., 1998; Adams et al., 2010). Dans l'étude menée par Adams et collaborateurs, un tel déséquilibre en isoformes Tau 0N/1N/2N n'a pas eu de conséquences *in vitro* sur la stabilité des microtubules (Adams et al., 2010). La stabilité du réseau microtubulaire dépend de son architecture et de son organisation en faisceaux parallèles correctement espacés les uns des autres. Il a été montré que les régions codées par les exons 2 et 3 étaient impliquées dans l'espacement entre les filaments de microtubules (Chen et al., 1992). Une récente étude menée par Rosenberg et collaborateurs confirme cette fonction et propose un modèle où la région amino-terminale de Tau serait essentielle à la dimérisation de Tau et à la régulation de l'espacement entre faisceaux de microtubules (Rosenberg et al., 2008). Les régions codées par les exons 2 et 3 de Tau sont acides et chargent négativement le domaine de projection de la protéine. Les auteurs montrent que Tau se dimérise de façon antiparallèle via une interaction électrostatique entre son domaine de projection (acide) et son domaine riche en résidus prolines (basique). Cette propriété de dimérisation contribuerait à maintenir l'architecture des faisceaux de microtubules (Rosenberg et al., 2008). Un changement du *ratio* en isoformes Tau 0N/1N/2N, où l'isoforme 0N serait surexprimée, pourrait réprimer cette dimérisation (la force d'interaction entre deux molécules Tau serait plus faible) et aurait pour conséquences de déstabiliser la structure des microtubules et d'augmenter la concentration de formes Tau libres.

Tau n'est probablement pas qu'une protéine axonale ni qu'une protéine de stabilisation des microtubules. Plusieurs faisceaux d'arguments lui attribuent également un rôle post-synaptique. En effet, la protéine Tau pourrait moduler la signalisation glutamatergique par la régulation de l'interaction de Fyn avec le récepteur NMDA (Ittner et al., 2010). Rappelons, qu'il existe également un défaut d'épissage de la sous-unité R1 du récepteur NMDA dans la DM1 (Jiang et al., 2004). Le défaut d'épissage de Tau couplé à celui du récepteur NMDA pourrait être à l'origine d'une dérégulation de la signalisation NMDA. A ce jour, nous ne savons pas si en fonction des isoformes Tau, l'interaction de Tau avec ses partenaires moléculaires telle que la

protéine Fyn ou sa localisation à la synapse pourrait être modulée par la présence des exons 2 et 3. Les exons 2 et 3 ajoutent un caractère acide et augmentent le caractère bipolaire de Tau. Nous ne disposons pas des données structurales sur les isoformes Tau mais nous pourrions supposer que l'addition des exons 2 et 3 favoriserait un repliement de la partie amino-terminale avec la région de liaison au microtubule, qui est la région basique. Dans la DM1, la perte des exons 2 et 3 pourrait faciliter le dépliement de la protéine et donc augmenter l'interaction du domaine amino-terminale avec les partenaires de Tau.

La preuve de concept qu'un changement en isoformes Tau, plus particulièrement celui lié à la surexpression de l'isoforme fœtale, suffit à induire la formation d'agrégats Tau a été apportée par la génération d'un modèle murin transgénique surexprimant l'isoforme Tau fœtale humaine (Ishihara et al., 1999). En effet, il a été montré que ces souris développaient une pathologie Tau similaire à celle observée dans les FTDP-17, caractérisée par la présence de protéines Tau pathologiques et plus particulièrement l'isoforme fœtale. De plus, les auteurs ont remarqué que le développement de ces lésions était corrélé à l'âge. Néanmoins, il est important de souligner que le transgène a été exprimé sous le contrôle du promoteur fort murin gouvernant l'expression de la protéine prion. Or d'autres études ont montré que la surexpression de Tau, quelque soit son isoforme était suffisante à induire la formation d'agrégats Tau pathologiques (Gotz et al., 1995; Probst et al., 2000; Kimura et al., 2007; Adams et al., 2009). Parmi les lésions observées liées à la surexpression de Tau dans ce modèle murin, il a été décrit des perturbations du transport axonal. Or il a été décrit qu'un changement en isoformes de Tau était suffisant à induire des perturbations du transport axonal (Vershinin et al., 2007). En effet, comme nous l'avons décrit dans l'introduction, Tau interagit avec la kinésine (protéine moteur régulant le transport axonal). Cette interaction est modulée selon les différentes isoformes de Tau où les isoformes incluant les régions codées par les exons 2 et 3 la favoriserait et où celles les excluant l'inhiberait (Dixit et al., 2008).

Ainsi, au vu de ces résultats, on peut supposer que le changement de *ratio* en isoformes Tau observé dans la DM1 pourrait perturber le transport axonal en (1) déstabilisant le réseau microtubulaire et (2) réprimant l'interaction entre la kinésine et les microtubules conduisant donc à des dérégulations du transport des vésicules axonales. De façon intéressante, il a été montré qu'un défaut du transport axonal suffisait à perturber le métabolisme cellulaire et conduire à une neurodégénérescence (Morfini et al., 2009). De plus, il a été montré récemment qu'une souris invalidée pour l'expression de la protéine moteur kinésine 1 présentait (1) une augmentation de la phosphorylation de Tau et (2) une pathologie Tau (Falzone et al., 2010).

Cependant, il est important de rappeler que le développement de la pathologie Tau dans la DM1 n'a été observée que dans la région limbique et le lobe temporal des cerveaux analysés, alors que le changement d'épissage des exons 2 et 3 a été décrit dans toutes les régions cérébrales. Il semblerait donc que le développement de la pathologie Tau soit sélectif et dépendant de la région cérébrale. Comment expliquer la disparité entre la localisation cérébrale de la pathologie Tau qui est sélective et le changement d'épissage des exons 2 et 3 de Tau qui a été décrit dans toutes les régions cérébrales?

Le changement d'épissage des exons 2 et 3 de Tau ne semble pas être la seule composante essentielle au développement de la pathologie. L'instabilité somatique (comme discuté précédemment) mais aussi la vulnérabilité neuronale pourraient être impliquées dans son développement. En effet, il est intéressant de noter que dans l'ensemble des Tauopathies, la présence des agrégats Tau est souvent décrite dans la région limbique, et plus particulièrement l'hippocampe. Ainsi, il est possible que cette région cérébrale soit plus vulnérable et plus propice au développement de la pathologie. La région hippocampique est composée principalement de neurones pyramidaux qui présentent la particularité de former des longs prolongements axonaux qui se projettent dans les régions cérébrales voisines. Si l'hypothèse d'une perturbation du transport axonal liée au changement d'épissage de Tau s'avère vraie, il est intéressant de remarquer que ces cellules sont particulièrement plus sensibles à des perturbations du transport axonal dû très probablement à la taille de leurs prolongements. De même, un dysfonctionnement de ces cellules pourrait également avoir des conséquences fonctionnelles sur les régions dans lesquelles elles se projettent.

L'ensemble de ces questions nécessite une investigation plus poussée du rôle des isoformes de Tau et en particulier celle des exons 2 et 3. La DM1 constitue donc un bon modèle d'étude du changement en isoformes de Tau et nous permettra à terme de mieux comprendre la relation entre le changement d'épissage, la perte ou gain de fonction de Tau et le développement de la pathologie Tau dans le système limbique dans la DM1.

CONCLUSION / PERSPECTIVES

En conclusion, notre travail de thèse permet d'apporter de nouveaux éléments à une meilleure compréhension de la physiopathologie de la DM1 et plus particulièrement sur ceux affectant le cerveau. Peu d'études se sont intéressées à cet organe bien que les patients DM1 présentent également une atteinte cérébrale caractérisée entre autre par des troubles de la reconnaissance des émotions faciales. Ici, nous observons sur deux nouveaux cas DM1 une pathologie Tau localisée principalement dans les régions limbique et temporale, suggérant une éventuelle association avec les symptômes cliniques observés (la région limbique gouverne les émotions).

A l'échelle moléculaire, nos travaux mettent en lumière une dérégulation de l'épissage alternatif de Tau atypique : alors que les exons 2 et 3 sont systématiquement dérégulés, l'épissage alternatif de l'exon 10 ne l'est que chez certains cas DM1, suggérant potentiellement une composante génétique/environnementale. D'un point de vue mécanistique, nous avons observé que la dérégulation de l'épissage de l'exon 10 était corrélée à la surexpression du facteur d'épissage CELF2. Bien que les mécanismes impliqués dans la surexpression de CELF2 soient encore inconnus, il est tout à fait probable qu'ils soient reliés à des modifications post-traductionnelles anormales telles que la phosphorylation, comme il l'a été décrit pour CELF1. Ainsi, des études plus approfondies sur la phosphorylation de CELF2 pourraient contribuer à une meilleure compréhension du mécanisme d'action de CELF2 et donc de ses conséquences sur l'épissage alternatif mais également impliquer un déséquilibre de la balance kinase/phosphatase dans la DM1.

La surexpression des protéines CELF dans le cerveau DM1 n'est pas systématique, contrairement à la perte de fonction du facteur d'épissage MBNL1 allant de paire avec l'expression des répétitions CTG. Ici, nous montrons que tout comme dans le muscle, l'épissage alternatif de MBNL1 est également dérégulé dans le cerveau des patients DM1 et que ce changement d'épissage favoriserait sa séquestration dans les *foci*. Basés sur les données décrites dans le muscle et sur une étude de relation entre la structure et la fonction de MBNL1, nous montrons dans des cellules HeLa et dans des myoblastes DM1 que la liaison de MBNL1 aux répétitions CUG peut être contrecarrée par son domaine de liaison aux ARN seul. Il serait intéressant d'étendre notre étude à des cellules de type neuronal DM1 voire même à un modèle murin DM1. Ainsi, l'une des approches envisageable consisterait à exprimer stablement notre construction dans des cultures primaires de neurones issues de souris DM1 présentant un

changement d'épissage de Tau, NMDA-R1, APP et MBNL1 déjà établit (Gomes-Pereira et al., 2007).

L'ensemble de ces résultats démontre ainsi l'efficacité d'une approche à visée thérapeutique dans la DM1, basée sur la saturation des sites de liaisons aux motifs CUG mais soulèvent la question de l'innocuité des *foci*. Ainsi, afin d'améliorer notre outil, il serait intéressant de générer un nouvel outil moléculaire ayant les propriétés de (1) se lier efficacement aux motifs CUG et (2) de favoriser leurs dégradations.

Au total, notre étude aura permis de (1) mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la dérégulation de l'épissage alternatif de Tau dans la DM1 et de (2) généré un nouvel outil présentant un potentiel intérêt pour le développement d'une approche à visée thérapeutique. La régulation du métabolisme de Tau n'est pas altérée que dans la DM1 mais dans de nombreuses autres maladies neurodégénératives, communément appelées Tauopathies. Ainsi, notre étude aura permis de montrer que d'un point de vue fondamental, la DM1 présente un grand intérêt pour étudier la relation entre le changement d'épissage de Tau et le développement de la pathologie Tau. En effet, notre étude montre que le facteur d'épissage CELF2 pourrait également être impliqué dans d'autres Tauopathies sporadiques où un changement d'épissage aurait été observé. De plus, bien que très préliminaire, nous avons pu constaté que les régions affectées par une pathologie Tau étaient également celles où l'instabilité de la mutation étaient la plus importante. Ainsi, mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les phénomènes d'instabilité observés dans la DM1 pourrait permettre de mieux appréhender le rôle des systèmes de réparation de l'ADN sur le développement de la pathologie Tau.

BIBLIOGRAPHIE

A

Adams, S.J., Crook, R.J., Deture, M., Randle, S.J., Innes, A.E., Yu, X.Z., Lin, W.L., Dugger, B.N., McBride, M., Hutton, M., et al. (2009). Overexpression of wild-type murine tau results in progressive tauopathy and neurodegeneration. *Am J Pathol* 175, 1598-1609.

Adams, S.J., DeTure, M.A., McBride, M., Dickson, D.W., and Petrucelli, L. (2010). Three repeat isoforms of tau inhibit assembly of four repeat tau filaments. *PLoS One* 5, e10810.

Adereth, Y., Dammai, V., Kose, N., Li, R., and Hsu, T. (2005). RNA-dependent integrin alpha3 protein localization regulated by the Muscleblind-like protein MLP1. *Nat Cell Biol* 7, 1240-1247.

Alwazzan, M., Newman, E., Hamshere, M.G., and Brook, J.D. (1999). Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Hum Mol Genet* 8, 1491-1497.

Andreadis, A. (2005). Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1739, 91-103.

Andreadis, A., Broderick, J.A., and Kosik, K.S. (1995). Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res* 23, 3585-3593.

Andreadis, A., Brown, W.M., and Kosik, K.S. (1992). Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31, 10626-10633.

Andreadis, A., Wagner, B.K., Broderick, J.A., and Kosik, K.S. (1996). A tau promoter region without neuronal specificity. *J Neurochem* 66, 2257-2263.

Arambula, J.F., Ramisetty, S.R., Baranger, A.M., and Zimmerman, S.C. (2009). A simple ligand that selectively targets CUG trinucleotide repeats and inhibits MBNL protein binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16068-16073.

Arikan, M.C., Memmott, J., Broderick, J.A., Lafyatis, R., Sreaton, G., Stamm, S., and Andreadis, A. (2002). Modulation of the membrane-binding projection domain of tau protein: splicing regulation of exon 3. *Brain Res Mol Brain Res* 101, 109-121.

Arima, K. (2006). Ultrastructural characteristics of tau filaments in tauopathies: immuno-electron microscopic demonstration of tau filaments in tauopathies. *Neuropathology* 26, 475-483.

Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., and Hyman, B.T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 631-639.

Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., Perez-Alonso, M., and Baylies, M.K. (1998). The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2. *Dev Biol* 195, 131-143.

Ashizawa, T., Dunne, P.W., Ward, P.A., Seltzer, W.K., and Richards, C.S. (1994). Effects of the sex of myotonic dystrophy patients on the unstable triplet repeat in their affected offspring. *Neurology* 44, 120-122.

Atlas, I., and Smolin, A. (1999). Combined maternal and congenital myotonic dystrophy managed by a multidisciplinary team. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 87, 175-178.

Augustinack, J.C., Schneider, A., Mandelkow, E.M., and Hyman, B.T. (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 103, 26-35.

B

Baker, M., Litvan, I., Houlden, H., Adamson, J., Dickson, D., Perez-Tur, J., Hardy, J., Lynch, T., Bigio, E., and Hutton, M. (1999). Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 8, 711-715.

Ballatore, C., Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8, 663-672.

Barreau, C., Paillard, L., Mereau, A., and Osborne, H.B. (2006). Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions. *Biochimie* 88, 515-525.

Batten F, G.H. (1909). Myotonia Atrophica. *Brain* 32, 187-205.

Baumann, K., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Piwnica-Worms, H., and Mandelkow, E. (1993). Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett* 336, 417-424.

Begemann, G., Paricio, N., Artero, R., Kiss, I., Perez-Alonso, M., and Mlodzik, M. (1997). muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development* 124, 4321-4331.

Behar, L., Marx, R., Sadot, E., Barg, J., and Ginzburg, I. (1995). cis-acting signals and trans-acting proteins are involved in tau mRNA targeting into neurites of differentiating neuronal cells. *Int J Dev Neurosci* 13, 113-127.

Boeve, B.F., and Hutton, M. (2008). Refining frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17: introducing FTDP-17 (MAPT) and FTDP-17 (PGRN). *Arch Neurol* 65, 460-464.

Botta, A., Vallo, L., Rinaldi, F., Bonifazi, E., Amati, F., Biancolella, M., Gambardella, S., Mancinelli, E., Angelini, C., Meola, G., *et al.* (2007). Gene expression analysis in myotonic dystrophy: indications for a common molecular pathogenic pathway in DM1 and DM2. *Gene Expr* 13, 339-351.

Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-259.

Brandt, R., Leger, J., and Lee, G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131, 1327-1340.

Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V.P., Thirion, J.P., Hudson, T., *et al.* (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68, 799-808.

Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33, 95-130.

Buj-Bello, A., Furling, D., Tronchere, H., Laporte, J., Lerouge, T., Butler-Browne, G.S., and Mandel, J.L. (2002). Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells. *Hum Mol Genet* 11, 2297-2307.

Buratti, E., Brindisi, A., Giombi, M., Tisminetzky, S., Ayala, Y.M., and Baralle, F.E. (2005). TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *J Biol Chem* 280, 37572-37584.

Buratti, E., Dork, T., Zuccato, E., Pagani, F., Romano, M., and Baralle, F.E. (2001). Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *EMBO J* 20, 1774-1784.

Butler, M., and Shelanski, M.L. (1986). Microheterogeneity of microtubule-associated tau proteins is due to differences in phosphorylation. *J Neurochem* 47, 1517-1522.

C

Caceres, A., and Kosik, K.S. (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343, 461-463.

Caffrey, T.M., Joachim, C., Paracchini, S., Esiri, M.M., and Wade-Martins, R. (2006). Haplotype-specific expression of exon 10 at the human MAPT locus. *Hum Mol Genet* 15, 3529-3537.

Caffrey, T.M., and Wade-Martins, R. (2007). Functional MAPT haplotypes: bridging the gap between genotype and neuropathology. *Neurobiol Dis* 27, 1-10.

Carango, P., Noble, J.E., Marks, H.G., and Funanage, V.L. (1993). Absence of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) mRNA as a result of a triplet repeat expansion in myotonic dystrophy. *Genomics* 18, 340-348.

Castle, J.C., Zhang, C., Shah, J.K., Kulkarni, A.V., Kalsotra, A., Cooper, T.A., and Johnson, J.M. (2008). Expression of 24,426 human alternative splicing events and predicted cis regulation in 48 tissues and cell lines. *Nat Genet* 40, 1416-1425.

Chapple, J.P., Anthony, K., Martin, T.R., Dev, A., Cooper, T.A., and Gallo, J.M. (2007). Expression, localization and tau exon 10 splicing activity of the brain RNA-binding protein TNRC4. *Hum Mol Genet* 16, 2760-2769.

Charlet, B.N., Savkur, R.S., Singh, G., Philips, A.V., Grice, E.A., and Cooper, T.A. (2002). Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* 10, 45-53.

Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N.J., and Hirokawa, N. (1992). Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360, 674-677.

Chen, H.Y., Kathirvel, P., Yee, W.C., and Lai, P.S. (2009). Correction of dystrophin myotonia type 1 pre-mRNA transcripts by artificial trans-splicing. *Gene Ther* 16, 211-217.

Chen-Plotkin, A.S., Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (2010). TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6, 211-220.

Cho, D.H., Thienes, C.P., Mahoney, S.E., Analau, E., Filippova, G.N., and Tapscott, S.J. (2005). Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF. *Mol Cell* 20, 483-489.

Choi, D.K., Ito, T., Mitsui, Y., and Sakaki, Y. (1998). Fluorescent differential display analysis of gene expression in apoptotic neuroblastoma cells. *Gene* 223, 21-31.

Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M., *et al.* (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11, 909-913.

Conrad, C., Zhu, J., Schoenfeld, D., Fang, Z., Ingelsson, M., Stamm, S., Church, G., and Hyman, B.T. (2007). Single molecule profiling of tau gene expression in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 103, 1228-1236.

Couchie, D., Charriere-Bertrand, C., and Nunez, J. (1988). Expression of the mRNA for tau proteins during brain development and in cultured neurons and astroglial cells. *J Neurochem* 50, 1894-1899.

Couchie, D., Mavilia, C., Georgieff, I.S., Liem, R.K., Shelanski, M.L., and Nunez, J. (1992). Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4378-4381.

Cuchillo-Ibanez, I., Seereeram, A., Byers, H.L., Leung, K.Y., Ward, M.A., Anderton, B.H., and Hanger, D.P. (2008). Phosphorylation of tau regulates its axonal transport by controlling its binding to kinesin. *FASEB J* 22, 3186-3195.

D

D'Souza, I., Poorkaj, P., Hong, M., Nochlin, D., Lee, V.M., Bird, T.D., and Schellenberg, G.D. (1999). Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5598-5603.

D'Souza, I., and Schellenberg, G.D. (2000). Determinants of 4-repeat tau expression. Coordination between enhancing and inhibitory splicing sequences for exon 10 inclusion. *J Biol Chem* 275, 17700-17709.

D'Souza, I., and Schellenberg, G.D. (2002). tau Exon 10 expression involves a bipartite intron 10 regulatory sequence and weak 5' and 3' splice sites. *J Biol Chem* 277, 26587-26599.

Dansithong, W., Paul, S., Comai, L., and Reddy, S. (2005). MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1. *J Biol Chem* 280, 5773-5780.

Daughters, R.S., Tuttle, D.L., Gao, W., Ikeda, Y., Moseley, M.L., Ebner, T.J., Swanson, M.S., and Ranum, L.P. (2009). RNA gain-of-function in spinocerebellar ataxia type 8. *PLoS Genet* 5, e1000600.

Davis, B.M., McCurrach, M.E., Taneja, K.L., Singer, R.H., and Housman, D.E. (1997). Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7388-7393.

Delacourte, A., David, J.P., Sergeant, N., Buee, L., Wattez, A., Vermersch, P., Ghazali, F., Fallet-Bianco, C., Pasquier, F., Lebert, F., *et al.* (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52, 1158-1165.

Derkinderen, P., Scales, T.M., Hanger, D.P., Leung, K.Y., Byers, H.L., Ward, M.A., Lenz, C., Price, C., Bird, I.N., Perera, T., *et al.* (2005). Tyrosine 394 is phosphorylated in Alzheimer's paired helical filament tau and in fetal tau with c-Abl as the candidate tyrosine kinase. *J Neurosci* 25, 6584-6593.

Dhaenens, C.M., Schraen-Maschke, S., Tran, H., Vingtdeux, V., Ghanem, D., Leroy, O., Delplanque, J., Vanbrussel, E., Delacourte, A., Vermersch, P., *et al.* (2008). Overexpression of MBNL1 fetal isoforms and modified splicing of Tau in the DM1 brain: two individual consequences of CUG trinucleotide repeats. *Exp Neurol* 210, 467-478.

Di Costanzo, A., Di Salle, F., Santoro, L., Bonavita, V., and Tedeschi, G. (2002). Brain MRI features of congenital- and adult-form myotonic dystrophy type 1: case-control study. *Neuromuscul Disord* 12, 476-483.

Dixit, R., Ross, J.L., Goldman, Y.E., and Holzbaur, E.L. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 319, 1086-1089.

Donahue, L.A., Mangla, R., and Westesson, P.L. (2009). Neuroimaging in myotonic dystrophy type 1. *Neurology* 73, 1931.

Dotti, C.G., Banker, G.A., and Binder, L.I. (1987). The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience* 23, 121-130.

Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., and Kirschner, M.W. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3, 1141-1154.

Duyckaerts, C., Bennefib, M., Grignon, Y., Uchihara, T., He, Y., Piette, F., and Hauw, J.J. (1997). Modeling the relation between neurofibrillary tangles and intellectual status. *Neurobiol Aging* 18, 267-273.

Duyckaerts, C., Delatour, B., and Potier, M.C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 118, 5-36.

E

Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., and Mandelkow, E. (1998). Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 143, 777-794.

Ebralidze, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebralidze, K., and Junghans, R.P. (2004). RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science* 303, 383-387.

Evans, W., Fung, H.C., Steele, J., Eerola, J., Tienari, P., Pittman, A., Silva, R., Myers, A., Vrieze, F.W., Singleton, A., *et al.* (2004). The tau H2 haplotype is almost exclusively Caucasian in origin. *Neurosci Lett* 369, 183-185.

Edwards, K.J., Jenkins, T.C., and Neidle, S. (1992). Crystal structure of a pentamidine-oligonucleotide complex: implications for DNA-binding properties. *Biochemistry* 31, 7104-7109.

F

Falzone, T.L., Gunawardena, S., McCleary, D., Reis, G.F., and Goldstein, L.S. (2010). Kinesin-1 transport reductions enhance human tau hyperphosphorylation, aggregation and neurodegeneration in animal models of tauopathies. *Hum Mol Genet* 19, 4399-4408.

Fardaei, M., Larkin, K., Brook, J.D., and Hamshere, M.G. (2001). In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Res* 29, 2766-2771.

Fardaei, M., Rogers, M.T., Thorpe, H.M., Larkin, K., Hamshere, M.G., Harper, P.S., and Brook, J.D. (2002). Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet* 11, 805-814.

Faustino, N.A., and Cooper, T.A. (2005). Identification of putative new splicing targets for ETR-3 using sequences identified by systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Mol Cell Biol* 25, 879-887.

Fernandes, J.M., Kinghorn, J.R., and Johnston, I.A. (2007). Characterization of two paralogous muscleblind-like genes from the tiger pufferfish (*Takifugu rubripes*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 146, 180-186.

Fernandez-Costa, J.M., and Artero, R. (2010). A conserved motif controls nuclear localization of *Drosophila* Muscleblind. *Mol Cells* 30, 65-70.

Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W., and Luhrmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82, 475-483.

Freibaum, B.D., Chitta, R.K., High, A.A., and Taylor, J.P. (2010). Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery. *J Proteome Res* 9, 1104-1120.

Frost, B., and Diamond, M.I. (2010). Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 11, 155-159.

Frost, B., Jacks, R.L., and Diamond, M.I. (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 284, 12845-12852.

Fu, Y.H., Friedman, D.L., Richards, S., Pearlman, J.A., Gibbs, R.A., Pizzuti, A., Ashizawa, T., Perryman, M.B., Scarlato, G., Fenwick, R.G., Jr., *et al.* (1993). Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* 260, 235-238.

Fu, Y.H., Pizzuti, A., Fenwick, R.G., Jr., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P.W., Dubel, J., Nasser, G.A., Ashizawa, T., de Jong, P., *et al.* (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255, 1256-1258.

Furling, D., Lemieux, D., Taneja, K., and Puymirat, J. (2001). Decreased levels of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and delayed differentiation in human myotonic dystrophy myoblasts. *Neuromuscul Disord* 11, 728-735.

Furling, D., Doucet, G., Langlois, M.A., Timchenko, L., Belanger, E., Cossette, L., and Puymirat, J. (2003). Viral vector producing antisense RNA restores myotonic dystrophy myoblast functions. *Gene Ther* 10, 795-802.

G

Gallo, J.M., and Spickett, C. (2010). The role of CELF proteins in neurological disorders. *RNA Biol* 7.

Gao, Q.S., Memmott, J., Lafyatis, R., Stamm, S., Sreaton, G., and Andreadis, A. (2000). Complex regulation of tau exon 10, whose missplicing causes frontotemporal dementia. *J Neurochem* 74, 490-500.

Garcia-Arocena, D., and Hagerman, P.J. (2010). Advances in understanding the molecular basis of FXTAS. *Hum Mol Genet* 19, R83-89.

Georgieff, I.S., Liem, R.K., Couchie, D., Mavilia, C., Nunez, J., and Shelanski, M.L. (1993). Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *J Cell Sci* 105 (Pt 3), 729-737.

Ghanem, D., Tran, H., Dhaenens, C.M., Schraen-Maschke, S., Sablonniere, B., Buee, L., Sergeant, N., and Caillet-Boudin, M.L. (2009). Altered splicing of Tau in DM1 is different from the foetal splicing process. *FEBS Lett* 583, 675-679.

Goedert, M. (1998). Neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease and other tauopathies. *Prog Brain Res* 117, 287-306.

Goedert, M., Spillantini, M.G., and Crowther, R.A. (1992). Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1983-1987.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R.A. (1989a). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519-526.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., and Crowther, R.A. (1989b). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J* 8, 393-399.

Goers, E.S., Purcell, J., Voelker, R.B., Gates, D.P., and Berglund, J.A. (2010). MBNL1 binds GC motifs embedded in pyrimidines to regulate alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 38, 2467-2484.

Gomes-Pereira, M., Foiry, L., Nicole, A., Huguet, A., Junien, C., Munnich, A., and Gourdon, G. (2007). CTG trinucleotide repeat "big jumps": large expansions, small mice. *PLoS Genet* 3, e52.

Goode, B.L., and Feinstein, S.C. (1994). Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol* 124, 769-782.

Gotz, J., Probst, A., Spillantini, M.G., Schafer, T., Jakes, R., Burki, K., and Goedert, M. (1995). Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J* 14, 1304-1313.

Greenwood, J.A., Scott, C.W., Spreen, R.C., Caputo, C.B., and Johnson, G.V. (1994). Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor. *J Biol Chem* 269, 4373-4380.

Groenen, P.J., Wansink, D.G., Coerwinkel, M., van den Broek, W., Jansen, G., and Wieringa, B. (2000). Constitutive and regulated modes of splicing produce six major myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) isoforms with distinct properties. *Hum Mol Genet* 9, 605-616.

Grover, A., Houlden, H., Baker, M., Adamson, J., Lewis, J., Prihar, G., Pickering-Brown, S., Duff, K., and Hutton, M. (1999). 5' splice site mutations in tau associated with the inherited dementia FTDP-17 affect a stem-loop structure that regulates alternative splicing of exon 10. *J Biol Chem* 274, 15134-15143.

Guttler, T., Madl, T., Neumann, P., Deichsel, D., Corsini, L., Monecke, T., Ficner, R., Sattler, M., and Gorlich, D. (2010). NES consensus redefined by structures of PKI-type and Rev-type nuclear export signals bound to CRM1. *Nat Struct Mol Biol*.

H

Hamdane, M., Sambo, A.V., Delobel, P., Begard, S., Violleau, A., Delacourte, A., Bertrand, P., Benavides, J., and Buee, L. (2003). Mitotic-like tau phosphorylation by p25-Cdk5 kinase complex. *J Biol Chem* 278, 34026-34034.

Hanger, D.P., Anderton, B.H., and Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* 15, 112-119.

Hanger, D.P., Hughes, K., Woodgett, J.R., Brion, J.P., and Anderton, B.H. (1992). Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* 147, 58-62.

Harley, H.G., Brook, J.D., Rundle, S.A., Crow, S., Reardon, W., Buckler, A.J., Harper, P.S., Housman, D.E., and Shaw, D.J. (1992). Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* 355, 545-546.

Harper, P. (2001). *Myotonic Dystrophy*. ed WB Saunders 3rd edition.

Harper, P.S., Harley, H.G., Reardon, W., and Shaw, D.J. (1992). Anticipation in myotonic dystrophy: new light on an old problem. *Am J Hum Genet* 51, 10-16.

- Hartmann, A.M., Rujescu, D., Giannakouros, T., Nikolakaki, E., Goedert, M., Mandelkow, E.M., Gao, Q.S., Andreadis, A., and Stamm, S. (2001). Regulation of alternative splicing of human tau exon 10 by phosphorylation of splicing factors. *Mol Cell Neurosci* 18, 80-90.
- He, Y., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Papadopoulos, N., and Kinzler, K.W. (2008). The antisense transcriptomes of human cells. *Science* 322, 1855-1857.
- Heicklen-Klein, A., and Ginzburg, I. (2000). Tau promoter confers neuronal specificity and binds Sp1 and AP-2. *J Neurochem* 75, 1408-1418.
- Hernandez, F., Perez, M., Lucas, J.J., Mata, A.M., Bhat, R., and Avila, J. (2004). Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279, 3801-3806.
- Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M.W., and Martin, D.W., Jr. (1989). Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 9, 1381-1388.
- Ho, T.H., Bundman, D., Armstrong, D.L., and Cooper, T.A. (2005). Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 14, 1539-1547.
- Ho, T.H., Charlet, B.N., Poulos, M.G., Singh, G., Swanson, M.S., and Cooper, T.A. (2004). Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J* 23, 3103-3112.
- Hof, P.R., Bouras, C., Perl, D.P., and Morrison, J.H. (1994). Quantitative neuropathologic analysis of Pick's disease cases: cortical distribution of Pick bodies and coexistence with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 87, 115-124.
- Hof, P.R., Cox, K., and Morrison, J.H. (1990). Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex. *J Comp Neurol* 301, 44-54.
- Holzer, M., Gartner, U., Klinz, F.J., Narz, F., Heumann, R., and Arendt, T. (2001). Activation of mitogen-activated protein kinase cascade and phosphorylation of cytoskeletal proteins after neurone-specific activation of p21ras. I. Mitogen-activated protein kinase cascade. *Neuroscience* 105, 1031-1040.
- Houlden, H., Baker, M., Morris, H.R., MacDonald, N., Pickering-Brown, S., Adamson, J., Lees, A.J., Rossor, M.N., Quinn, N.P., Kertesz, A., *et al.* (2001). Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype. *Neurology* 56, 1702-1706.
- Houseley, J.M., Wang, Z., Brock, G.J., Soloway, J., Artero, R., Perez-Alonso, M., O'Dell, K.M., and Monckton, D.G. (2005). Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to Drosophila. *Hum Mol Genet* 14, 873-883.
- Hua, Q., and He, R.Q. (2003). Tau could protect DNA double helix structure. *Biochim Biophys Acta* 1645, 205-211.
- Hua, Q., He, R.Q., Haque, N., Qu, M.H., del Carmen Alonso, A., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2003). Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA. *Cell Mol Life Sci* 60, 413-421.
- Huang, H., Wahlin, K.J., McNally, M., Irving, N.D., and Adler, R. (2008). Developmental regulation of muscleblind-like (MBNL) gene expression in the chicken embryo retina. *Dev Dyn* 237, 286-296.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., *et al.* (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702-705.
- Hwang, D.M., Hwang, W.S., and Liew, C.C. (1994). Single pass sequencing of a unidirectional human fetal heart cDNA library to discover novel genes of the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol* 26, 1329-1333.

I

Ishihara, T., Hong, M., Zhang, B., Nakagawa, Y., Lee, M.K., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1999). Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24, 751-762.

Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wolfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., *et al.* (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142, 387-397.

J

Jansen, G., Groenen, P.J., Bachner, D., Jap, P.H., Coerwinkel, M., Oerlemans, F., van den Broek, W., Gohlsch, B., Pette, D., Plomp, J.J., *et al.* (1996). Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet* 13, 316-324.

Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M.S., Moxley, R.T., and Thornton, C.A. (2004). Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum Mol Genet* 13, 3079-3088.

K

Kaliman, P., and Llagostera, E. (2008). Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1. *Cell Signal* 20, 1935-1941.

Kalsotra, A., Xiao, X., Ward, A.J., Castle, J.C., Johnson, J.M., Burge, C.B., and Cooper, T.A. (2008). A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20333-20338.

Kanadia, R.N., Johnstone, K.A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C.A., Esson, D., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W., and Swanson, M.S. (2003a). A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 302, 1978-1980.

Kanadia, R.N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S.G., Wheeler, T.M., Thornton, C.A., and Swanson, M.S. (2006). Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11748-11753.

Kanadia, R.N., Urbinati, C.R., Crusselle, V.J., Luo, D., Lee, Y.J., Harrison, J.K., Oh, S.P., and Swanson, M.S. (2003b). Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3. *Gene Expr Patterns* 3, 459-462.

Kellerer, M., Lammers, R., Ermel, B., Tippmer, S., Vogt, B., Obermaier-Kusser, B., Ullrich, A., and Haring, H.U. (1992). Distinct alpha-subunit structures of human insulin receptor A and B variants determine differences in tyrosine kinase activities. *Biochemistry* 31, 4588-4596.

Kiliszek, A., Kierzek, R., Krzyzosiak, W.J., and Rypniewski, W. (2009). Structural insights into CUG repeats containing the 'stretched U-U wobble': implications for myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res* 37, 4149-4156.

Kimura, T., Yamashita, S., Fukuda, T., Park, J.M., Murayama, M., Mizoroki, T., Yoshiike, Y., Sahara, N., and Takashima, A. (2007). Hyperphosphorylated tau in parahippocampal cortex impairs place learning in aged mice expressing wild-type human tau. *EMBO J* 26, 5143-5152.

- Kino, Y., Mori, D., Oma, Y., Takeshita, Y., Sasagawa, N., and Ishiura, S. (2004). Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Hum Mol Genet* 13, 495-507.
- Klesert, T.R., Cho, D.H., Clark, J.I., Maylie, J., Adelman, J., Snider, L., Yuen, E.C., Soriano, P., and Tapscott, S.J. (2000). Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat Genet* 25, 105-109.
- Klesert, T.R., Otten, A.D., Bird, T.D., and Tapscott, S.J. (1997). Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP. *Nat Genet* 16, 402-406.
- Kornblum, C., Reul, J., Kress, W., Grothe, C., Amanatidis, N., Klockgether, T., and Schroder, R. (2004). Cranial magnetic resonance imaging in genetically proven myotonic dystrophy type 1 and 2. *J Neurol* 251, 710-714.
- Koshelev, M., Sarma, S., Price, R.E., Wehrens, X.H., and Cooper, T.A. (2010). Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 19, 1066-1075.
- Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Bakalis, S., and Neve, R.L. (1989). Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2, 1389-1397.
- Krol, J., Fiszer, A., Mykowska, A., Sobczak, K., de Mezer, M., and Krzyzosiak, W.J. (2007). Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets. *Mol Cell* 25, 575-586.
- Kuyumcu-Martinez, N.M., Wang, G.S., and Cooper, T.A. (2007). Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell* 28, 68-78.
- Kwok, J.B., Teber, E.T., Loy, C., Hallupp, M., Nicholson, G., Mellick, G.D., Buchanan, D.D., Silburn, P.A., and Schofield, P.R. (2004). Tau haplotypes regulate transcription and are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 55, 329-334.

L

- Ladd, A.N., Charlet, N., and Cooper, T.A. (2001). The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol Cell Biol* 21, 1285-1296.
- Ladd, A.N., Stenberg, M.G., Swanson, M.S., and Cooper, T.A. (2005). Dynamic balance between activation and repression regulates pre-mRNA alternative splicing during heart development. *Dev Dyn* 233, 783-793.
- Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2010). TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 19, R46-64.
- Langlois, M.A., Lee, N.S., Rossi, J.J., and Puymirat, J. (2003). Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts. *Mol Ther* 7, 670-680.
- Langlois, M.A., Boniface, C., Wang, G., Alluin, J., Salvaterra, P.M., Puymirat, J., Rossi, J.J., and Lee, N.S. (2005). Cytoplasmic and nuclear retained DMPK mRNAs are targets for RNA interference in myotonic dystrophy cells. *J Biol Chem* 280, 16949-16954.
- Lavedan, C., Hofmann-Radvanyi, H., Shelbourne, P., Rabes, J.P., Duros, C., Savoy, D., Dehaupas, I., Luce, S., Johnson, K., and Junien, C. (1993). Myotonic dystrophy: size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism. *Am J Hum Genet* 52, 875-883.
- Lee, G. (2005). Tau and src family tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1739, 323-330.

- Lee, G., Cowan, N., and Kirschner, M. (1988). The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science* 239, 285-288.
- Lee, G., Newman, S.T., Gard, D.L., Band, H., and Panchamoorthy, G. (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* 111 (Pt 21), 3167-3177.
- Lee, G., Thangavel, R., Sharma, V.M., Litersky, J.M., Bhaskar, K., Fang, S.M., Do, L.H., Andreadis, A., Van Hoesen, G., and Ksiezak-Reding, H. (2004). Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24, 2304-2312.
- Leppert, J., Urbinati, C.R., Hafner, S., Ohlenschlager, O., Swanson, M.S., Gorlach, M., and Ramachandran, R. (2004). Identification of NH...N hydrogen bonds by magic angle spinning solid state NMR in a double-stranded RNA associated with myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res* 32, 1177-1183.
- LeProust, E.M., Pearson, C.E., Sinden, R.R., and Gao, X. (2000). Unexpected formation of parallel duplex in GAA and TTC trinucleotide repeats of Friedreich's ataxia. *J Mol Biol* 302, 1063-1080.
- Leroy, O., Dhaenens, C.M., Schraen-Maschke, S., Belarbi, K., Delacourte, A., Andreadis, A., Sablonniere, B., Buee, L., Sergeant, N., and Caillet-Boudin, M.L. (2006a). ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type I. *J Neurosci Res* 84, 852-859.
- Leroy, O., Wang, J., Maurage, C.A., Parent, M., Cooper, T., Buee, L., Sergeant, N., Andreadis, A., and Caillet-Boudin, M.L. (2006b). Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1. *Biochim Biophys Acta* 1762, 460-467.
- Li, D., Bachinski, L.L., and Roberts, R. (2001). Genomic organization and isoform-specific tissue expression of human NAPOR (CUGBP2) as a candidate gene for familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Genomics* 74, 396-401.
- Li, K., Arikan, M.C., and Andreadis, A. (2003). Modulation of the membrane-binding domain of tau protein: splicing regulation of exon 2. *Brain Res Mol Brain Res* 116, 94-105.
- Lin, X., Miller, J.W., Mankodi, A., Kanadia, R.N., Yuan, Y., Moxley, R.T., Swanson, M.S., and Thornton, C.A. (2006). Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 15, 2087-2097.
- Lindwall, G., and Cole, R.D. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 259, 5301-5305.
- Liquori, C.L., Ricker, K., Moseley, M.L., Jacobsen, J.F., Kress, W., Naylor, S.L., Day, J.W., and Ranum, L.P. (2001). Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293, 864-867.
- Liu, F., and Gong, C.X. (2008). Tau exon 10 alternative splicing and tauopathies. *Mol Neurodegener* 3, 8.
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.X. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 22, 1942-1950.
- Liu, Y.F., Liu, H.Y., Tu, L.C., Lin, C.W., Hsiao, K.M., and Pan, H. (2008). Zebrafish muscleblind-like genes: identification, structural features and expression. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 151, 118-124.
- Loomis, P.A., Howard, T.H., Castleberry, R.P., and Binder, L.I. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8422-8426.
- Lu, X., Timchenko, N.A., and Timchenko, L.T. (1999). Cardiac elav-type RNA-binding protein (ETR-3) binds to RNA CUG repeats expanded in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 8, 53-60.
- Luo, M.H., Leski, M.L., and Andreadis, A. (2004). Tau isoforms which contain the domain encoded by exon 6 and their role in neurite elongation. *J Cell Biochem* 91, 880-895.

M

- Maeda, M., Taft, C.S., Bush, E.W., Holder, E., Bailey, W.M., Neville, H., Perryman, M.B., and Bies, R.D. (1995). Identification, tissue-specific expression, and subcellular localization of the 80- and 71-kDa forms of myotonic dystrophy kinase protein. *J Biol Chem* *270*, 20246-20249.
- Magnani, E., Fan, J., Gasparini, L., Golding, M., Williams, M., Schiavo, G., Goedert, M., Amos, L.A., and Spillantini, M.G. (2007). Interaction of tau protein with the dynactin complex. *EMBO J* *26*, 4546-4554.
- Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K., *et al.* (1992). Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* *255*, 1253-1255.
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., and Thornton, C.A. (2000). Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* *289*, 1769-1773.
- Mankodi, A., Takahashi, M.P., Jiang, H., Beck, C.L., Bowers, W.J., Moxley, R.T., Cannon, S.C., and Thornton, C.A. (2002). Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of *ClC-1* chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell* *10*, 35-44.
- Mankodi, A., Urbinati, C.R., Yuan, Q.P., Moxley, R.T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M.S., and Thornton, C.A. (2001). Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet* *10*, 2165-2170.
- Maurage, C.A., Udd, B., Ruchoux, M.M., Vermersch, P., Kalimo, H., Krahe, R., Delacourte, A., and Sergeant, N. (2005). Similar brain tau pathology in DM2/PROMM and DM1/Steinert disease. *Neurology* *65*, 1636-1638.
- McAuliffe, J.J., Gao, L.Z., and Solaro, R.J. (1990). Changes in myofibrillar activation and troponin C Ca²⁺ binding associated with troponin T isoform switching in developing rabbit heart. *Circ Res* *66*, 1204-1216.
- McMurray, C.T. (2010). Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nat Rev Genet* *11*, 786-799.
- Michalowski, S., Miller, J.W., Urbinati, C.R., Paliouras, M., Swanson, M.S., and Griffith, J. (1999). Visualization of double-stranded RNAs from the myotonic dystrophy protein kinase gene and interactions with CUG-binding protein. *Nucleic Acids Res* *27*, 3534-3542.
- Miller, J.W., Urbinati, C.R., Teng-Umuay, P., Stenberg, M.G., Byrne, B.J., Thornton, C.A., and Swanson, M.S. (2000). Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J* *19*, 4439-4448.
- Modoni, A., Silvestri, G., Vita, M.G., Quaranta, D., Tonali, P.A., and Marra, C. (2008). Cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1 (DM1): a longitudinal follow-up study. *J Neurol* *255*, 1737-1742.
- Mooers, B.H., Logue, J.S., and Berglund, J.A. (2005). The structural basis of myotonic dystrophy from the crystal structure of CUG repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 16626-16631.
- Morfini, G.A., Burns, M., Binder, L.I., Kanaan, N.M., LaPointe, N., Bosco, D.A., Brown, R.H., Jr., Brown, H., Tiwari, A., Hayward, L., *et al.* (2009). Axonal transport defects in neurodegenerative diseases. *J Neurosci* *29*, 12776-12786.
- Moseley, M.L., Zu, T., Ikeda, Y., Gao, W., Mosemiller, A.K., Daughters, R.S., Chen, G., Weatherspoon, M.R., Clark, H.B., Ebner, T.J., *et al.* (2006). Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8. *Nat Genet* *38*, 758-769.

Muramatsu, K., Hashimoto, Y., Uemura, T., Kunii, M., Harada, R., Sato, T., Morikawa, A., and Harada, A. (2008). Neuron-specific recombination by Cre recombinase inserted into the murine tau locus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 370, 419-423.

Mulders, S.A., van den Broek, W.J., Wheeler, T.M., Croes, H.J., van Kuik-Romeijn, P., de Kimpe, S.J., Furling, D., Platenburg, G.J., Gourdon, G., Thornton, C.A., et al. (2009). Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13915-13920.

Myers, A.J., Kaleem, M., Marlowe, L., Pittman, A.M., Lees, A.J., Fung, H.C., Duckworth, J., Leung, D., Gibson, A., Morris, C.M., et al. (2005). The H1c haplotype at the MAPT locus is associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 14, 2399-2404.

Myers, A.J., Pittman, A.M., Zhao, A.S., Rohrer, K., Kaleem, M., Marlowe, L., Lees, A., Leung, D., McKeith, I.G., Perry, R.H., et al. (2007). The MAPT H1c risk haplotype is associated with increased expression of tau and especially of 4 repeat containing transcripts. *Neurobiol Dis* 25, 561-570.

N

Napierala, M., and Krzyzosiak, W.J. (1997). CUG repeats present in myotonin kinase RNA form metastable "slippery" hairpins. *J Biol Chem* 272, 31079-31085.

Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., and Donlon, T.A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res* 387, 271-280.

Novelli, G., Gennarelli, M., Zelano, G., Pizzuti, A., Fattorini, C., Caskey, C.T., and Dallapiccola, B. (1993). Failure in detecting mRNA transcripts from the mutated allele in myotonic dystrophy muscle. *Biochem Mol Biol Int* 29, 291-297.

Nunez, J., and Fischer, I. (1997). Microtubule-associated proteins (MAPs) in the peripheral nervous system during development and regeneration. *J Mol Neurosci* 8, 207-222.

O

Osborne, R.J., Lin, X., Welle, S., Sobczak, K., O'Rourke, J.R., Swanson, M.S., and Thornton, C.A. (2009). Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 18, 1471-1481.

Otten, A.D., and Tapscott, S.J. (1995). Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5465-5469.

Ou, S.H., Wu, F., Harrich, D., Garcia-Martinez, L.F., and Gaynor, R.B. (1995). Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J Virol* 69, 3584-3596.

P

Paillard, L., Legagneux, V., and Beverley Osborne, H. (2003). A functional deadenylation assay identifies human CUG-BP as a deadenylation factor. *Biol Cell* 95, 107-113.

Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., and Blencowe, B.J. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* 40, 1413-1415.

Pascual, M., Vicente, M., Monferrer, L., and Artero, R. (2006). The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation* 74, 65-80.

Paul, S., Dansithong, W., Kim, D., Rossi, J., Webster, N.J., Comai, L., and Reddy, S. (2006). Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *EMBO J* 25, 4271-4283.

Philips, A.V., Timchenko, L.T., and Cooper, T.A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737-741.

Phylactou, L.A., Darrach, C., and Wood, M.J. (1998). Ribozyme-mediated trans-splicing of a trinucleotide repeat. *Nat Genet* 18, 378-381.

Pittman, A.M., Myers, A.J., Duckworth, J., Bryden, L., Hanson, M., Abou-Sleiman, P., Wood, N.W., Hardy, J., Lees, A., and de Silva, R. (2004). The structure of the tau haplotype in controls and in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 13, 1267-1274.

Probst, A., Gotz, J., Wiederhold, K.H., Tolnay, M., Mistl, C., Jatton, A.L., Hong, M., Ishihara, T., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., et al. (2000). Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol* 99, 469-481.

R

Rabin, S.J., Kim, J.M., Baughn, M., Libby, R.T., Kim, Y.J., Fan, Y., La Spada, A., Stone, B., and Ravits, J. (2010). Sporadic ALS has compartment-specific aberrant exon splicing and altered cell-matrix adhesion biology. *Hum Mol Genet* 19, 313-328.

Rademakers, R., Melquist, S., Cruts, M., Theuns, J., Del-Favero, J., Poorkaj, P., Baker, M., Sleegers, K., Crook, R., De Pooter, T., et al. (2005). High-density SNP haplotyping suggests altered regulation of tau gene expression in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 14, 3281-3292.

Ranum, L.P., and Cooper, T.A. (2006). RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu Rev Neurosci* 29, 259-277.

Reddy, S., Smith, D.B., Rich, M.M., Lefterovich, J.M., Reilly, P., Davis, B.M., Tran, K., Rayburn, H., Bronson, R., Cros, D., et al. (1996). Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet* 13, 325-335.

Reynolds, C.H., Garwood, C.J., Wray, S., Price, C., Kellie, S., Perera, T., Zvelebil, M., Yang, A., Sheppard, P.W., Vardell, I.M., et al. (2008). Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J Biol Chem* 283, 18177-18186.

Romeo, V., Pegoraro, E., Ferrati, C., Squarzanti, F., Soraru, G., Palmieri, A., Zucchetta, P., Antunovic, L., Bonifazi, E., Novelli, G., et al. (2010). Brain involvement in myotonic dystrophies: neuroimaging and neuropsychological comparative study in DM1 and DM2. *J Neurol* 257, 1246-1255.

Rosenberg, K.J., Ross, J.L., Feinstein, H.E., Feinstein, S.C., and Israelachvili, J. (2008). Complementary dimerization of microtubule-associated tau protein: Implications for microtubule bundling and tau-mediated pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7445-7450.

Rudnicki, D.D., Holmes, S.E., Lin, M.W., Thornton, C.A., Ross, C.A., and Margolis, R.L. (2007). Huntington's disease--like 2 is associated with CUG repeat-containing RNA foci. *Ann Neurol* 61, 272-282.

S

Sadot, E., Hecklen-Klein, A., Barg, J., Lazarovici, P., and Ginzburg, I. (1996). Identification of a tau promoter region mediating tissue-specific-regulated expression in PC12 cells. *J Mol Biol* 256, 805-812.

Sadot, E., Marx, R., Barg, J., Behar, L., and Ginzburg, I. (1994). Complete sequence of 3'-untranslated region of Tau from rat central nervous system. Implications for mRNA heterogeneity. *J Mol Biol* 241, 325-331.

Sarkar, P.S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., Chai, Y., Stout, J.T., and Reddy, S. (2000). Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat Genet* 25, 110-114.

Savkur, R.S., Philips, A.V., and Cooper, T.A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 29, 40-47.

Schweers, O., Schonbrunn-Hanebeck, E., Marx, A., and Mandelkow, E. (1994). Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J Biol Chem* 269, 24290-24297.

Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M.L., Grognet, P., Bombois, S., Blum, D., Delacourte, A., Pasquier, F., Vanmechelen, E., *et al.* (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics* 5, 207-224.

Sergeant, N., David, J.P., Goedert, M., Jakes, R., Vermersch, P., Buee, L., Lefranc, D., Wattez, A., and Delacourte, A. (1997). Two-dimensional characterization of paired helical filament-tau from Alzheimer's disease: demonstration of an additional 74-kDa component and age-related biochemical modifications. *J Neurochem* 69, 834-844.

Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C.A., Wattez, A., Vermersch, P., and Delacourte, A. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 10, 2143-2155.

Seznec, H., Agbulut, O., Sergeant, N., Savouret, C., Ghestem, A., Tabti, N., Willer, J.C., Ourth, L., Duros, C., Brisson, E., *et al.* (2001). Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum Mol Genet* 10, 2717-2726.

Shaw-Smith, C., Pittman, A.M., Willatt, L., Martin, H., Rickman, L., Gribble, S., Curley, R., Cumming, S., Dunn, C., Kalaitzopoulos, D., *et al.* (2006). Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. *Nat Genet* 38, 1032-1037.

Sharma, V.M., Litersky, J.M., Bhaskar, K., and Lee, G. (2007). Tau impacts on growth-factor-stimulated actin remodeling. *J Cell Sci* 120, 748-757.

Sjoberg, M.K., Shestakova, E., Mansuroglu, Z., Maccioni, R.B., and Bonnefoy, E. (2006). Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci* 119, 2025-2034.

Spillantini, M.G., Murrell, J.R., Goedert, M., Farlow, M.R., Klug, A., and Ghetti, B. (1998). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7737-7741.

Stanford, P.M., Shepherd, C.E., Halliday, G.M., Brooks, W.S., Schofield, P.W., Brodaty, H., Martins, R.N., Kwok, J.B., and Schofield, P.R. (2003). Mutations in the tau gene that cause an increase in three repeat tau and frontotemporal dementia. *Brain* 126, 814-826.

Steinert, H. (1909). Über das klinische und anatomische Bild des Muskelschwunds der Myotoniker. *Dtsch Z Nervenheilkd* 37, 58-104.

Stootherff, W.H., Bacsikai, B.J., and Hyman, B.T. (2008). Monitoring tau-tubulin interactions utilizing second harmonic generation in living neurons. *J Biomed Opt* 13, 064039.

Sultan, A., Nesslany, F., Violet, M., Bégard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., *et al.* (2010). Stress-induced nuclear translocation of tau prevents neuronal DNA damage.

Sun, T., and Zhang, Y. (2008). Pentamidine binds to tRNA through non-specific hydrophobic interactions and inhibits aminoacylation and translation. *Nucleic Acids Res* 36, 1654-1664.

T

Takeda, A., Kobayakawa, M., Suzuki, A., Tsuruya, N., and Kawamura, M. (2009). Lowered sensitivity to facial emotions in myotonic dystrophy type 1. *J Neurol Sci* 280, 35-39.

Takemura, R., Kanai, Y., and Hirokawa, N. (1991). In situ localization of tau mRNA in developing rat brain. *Neuroscience* 44, 393-407.

Teplova, M., and Patel, D.J. (2008). Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1. *Nat Struct Mol Biol* 15, 1343-1351.

Terenzi, F., and Ladd, A.N. (2010). Conserved developmental alternative splicing of muscleblind-like (MBNL) transcripts regulates MBNL localization and activity. *RNA Biol* 7, 43-55.

Thornton, C.A., Johnson, K., and Moxley, R.T., 3rd (1994). Myotonic dystrophy patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes. *Ann Neurol* 35, 104-107.

Thornton, C.A., Wymer, J.P., Simmons, Z., McClain, C., and Moxley, R.T., 3rd (1997). Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene. *Nat Genet* 16, 407-409.

Thurston, V.C., Pena, P., Pestell, R., and Binder, L.I. (1997). Nucleolar localization of the microtubule-associated protein tau in neuroblastomas using sense and anti-sense transfection strategies. *Cell Motil Cytoskeleton* 38, 100-110.

Timchenko, L.T. (1999). Myotonic dystrophy: the role of RNA CUG triplet repeats. *Am J Hum Genet* 64, 360-364.

Timchenko, L.T., Miller, J.W., Timchenko, N.A., DeVore, D.R., Datar, K.V., Lin, L., Roberts, R., Caskey, C.T., and Swanson, M.S. (1996). Identification of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res* 24, 4407-4414.

Timchenko, N.A., Cai, Z.J., Welm, A.L., Reddy, S., Ashizawa, T., and Timchenko, L.T. (2001a). RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem* 276, 7820-7826.

Timchenko, N.A., Iakova, P., Cai, Z.J., Smith, J.R., and Timchenko, L.T. (2001b). Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol Cell Biol* 21, 6927-6938.

Timchenko, N.A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z.J., Quan, L., and Timchenko, L.T. (2004). Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *J Biol Chem* 279, 13129-13139.

Tohgi, H., Utsugisawa, K., Nagane, Y., Yoshimura, M., Ukitsu, M., and Genda, Y. (1999). The methylation status of cytosines in a tau gene promoter region alters with age to downregulate transcriptional activity in human cerebral cortex. *Neurosci Lett* 275, 89-92.

Trinczek, B., Ebner, A., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1999). Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *J Cell Sci* 112 (Pt 14), 2355-2367.

Turner, C., and Hilton-Jones, D. (2010). The myotonic dystrophies: diagnosis and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81, 358-367.

U

Ule, J. (2008). Ribonucleoprotein complexes in neurologic diseases. *Curr Opin Neurobiol* 18, 516-523.

Utton, M.A., Noble, W.J., Hill, J.E., Anderton, B.H., and Hanger, D.P. (2005). Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and alpha-synuclein. *J Cell Sci* 118, 4645-4654.

V

Vandrovcova, J., Anaya, F., Kay, V., Lees, A., Hardy, J., and de Silva, R. (2010). Disentangling the Role of the tau Gene Locus in Sporadic Tauopathies. *Curr Alzheimer Res*.

Vermersch, P., Sergeant, N., Ruchoux, M.M., Hofmann-Radvanyi, H., Watzel, A., Petit, H., Dweilly, P., and Delacourte, A. (1996). Specific tau variants in the brains of patients with myotonic dystrophy. *Neurology* 47, 711-717.

Vershinin, M., Carter, B.C., Razafsky, D.S., King, S.J., and Gross, S.P. (2007). Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 87-92.

Vlasova, I.A., and Bohjanen, P.R. (2008). Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins. *RNA Biol* 5, 201-207.

W

Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S.F., Schroth, G.P., and Burge, C.B. (2008a). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456, 470-476.

Wang, G.S., Kearney, D.L., De Biasi, M., Taffet, G., and Cooper, T.A. (2007). Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 117, 2802-2811.

Wang, L.C., Hung, W.T., Pan, H., Chen, K.Y., Wu, Y.C., Liu, Y.F., and Hsiao, K.M. (2008b). Growth-dependent effect of muscleblind knockdown on *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 366, 705-709.

Wang, Y., Loomis, P.A., Zinkowski, R.P., and Binder, L.I. (1993). A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau. *J Cell Biol* 121, 257-267.

Wang, Y., Wang, J., Gao, L., Lafyatis, R., Stamm, S., and Andreadis, A. (2005). Tau exons 2 and 10, which are misregulated in neurodegenerative diseases, are partly regulated by silencers which bind a SRp30c.SRp55 complex that either recruits or antagonizes htra2beta1. *J Biol Chem* 280, 14230-14239.

Wang, Y.H., Amirhaeri, S., Kang, S., Wells, R.D., and Griffith, J.D. (1994). Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeats from the myotonic dystrophy gene. *Science* 265, 669-671.

Ward, A.J., Rimer, M., Killian, J.M., Dowling, J.J., and Cooper, T.A. (2010). CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 19, 3614-3622.

Warf, M.B., and Berglund, J.A. (2007). MBNL binds similar RNA structures in the CUG repeats of myotonic dystrophy and its pre-mRNA substrate cardiac troponin T. *RNA* 13, 2238-2251.

Warf, M.B., Diegel, J.V., von Hippel, P.H., and Berglund, J.A. (2009). The protein factors MBNL1 and U2AF65 bind alternative RNA structures to regulate splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9203-9208.

Warf, M.B., Nakamori, M., Matthys, C.M., Thornton, C.A., and Berglund, J.A. (2009b). Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18551-18556.

Weber, Y.G., Roebeling, R., Kassubek, J., Hoffmann, S., Rosenbohm, A., Wolf, M., Steinbach, P., Jurkat-Rott, K., Walter, H., Reske, S.N., *et al.* (2010). Comparative analysis of brain structure, metabolism, and cognition in myotonic dystrophy 1 and 2. *Neurology* 74, 1108-1117.

Wei, M.L., and Andreadis, A. (1998). Splicing of a regulated exon reveals additional complexity in the axonal microtubule-associated protein tau. *J Neurochem* 70, 1346-1356.

Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1858-1862.

Wheeler, T.M., Lueck, J.D., Swanson, M.S., Dirksen, R.T., and Thornton, C.A. (2007). Correction of CIC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 117, 3952-3957.

Wheeler, T.M., Sobczak, K., Lueck, J.D., Osborne, R.J., Lin, X., Dirksen, R.T., and Thornton, C.A. (2009). Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science* 325, 336-339.

Winblad, S., Hellstrom, P., Lindberg, C., and Hansen, S. (2006). Facial emotion recognition in myotonic dystrophy type 1 correlates with CTG repeat expansion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77, 219-223.

Y

Yuan, Y., Compton, S.A., Sobczak, K., Stenberg, M.G., Thornton, C.A., Griffith, J.D., and Swanson, M.S. (2007). Muscleblind-like 1 interacts with RNA hairpins in splicing target and pathogenic RNAs. *Nucleic Acids Res* 35, 5474-5486.

Yuan, Z., Agarwal-Mawal, A., and Paudel, H.K. (2004). 14-3-3 binds to and mediates phosphorylation of microtubule-associated tau protein by Ser9-phosphorylated glycogen synthase kinase 3beta in the brain. *J Biol Chem* 279, 26105-26114.

Z

Zhang, Y., Monckton, D.G., Siciliano, M.J., Connor, T.H., and Meistrich, M.L. (2002). Age and insertion site dependence of repeat number instability of a human DM1 transgene in individual mouse sperm. *Hum Mol Genet* 11, 791-798.

Zody, M.C., Jiang, Z., Fung, H.C., Antonacci, F., Hillier, L.W., Cardone, M.F., Graves, T.A., Kidd, J.M., Cheng, Z., Abouelleil, A., *et al.* (2008). Evolutionary toggling of the MAPT 17q21.31 inversion region. *Nat Genet* 40, 1076-1083.

ANNEXES