



HAL
open science

Expansion de triplets CTG et arrêt prolifératif précoce des myoblastes DM1

Erwan Gasnier

► **To cite this version:**

Erwan Gasnier. Expansion de triplets CTG et arrêt prolifératif précoce des myoblastes DM1. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66195 . tel-00829312

HAL Id: tel-00829312

<https://theses.hal.science/tel-00829312>

Submitted on 3 Jun 2013

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE et MARIE CURIE

École doctorale Complexité du Vivant (ED515)

Présentée par

Mr Erwan GASNIER

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'université PARIS VI

Spécialité Biologie Moléculaire et Cellulaire

Sujet de thèse :

**EXPANSION DE TRIPLETS CTG ET ARRET PROLIFERATIF
PRECOCE DES MYOBLASTES DM1**

Thèse dirigée par : Dr FURLING Denis

Soutenue le 13 Avril 2012

Devant le jury composé de :

Pr FRIGUET Bertrand

Dr BASSEZ Guillaume

Dr SERGEANT Nicolas

Dr AGBULU Onnik

Dr FURLING Denis

Président/Examineur

Examineur

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

EXPANSION DE TRIPLETS CTG ET ARRET
PROLIFERATIF PRECOCE DES MYOBLASTES DM1

Thèse réalisée au sein du laboratoire :

Thérapie des maladies du muscle strié - Institut de Myologie
UPMC Univ. Paris 6, Um76 / Inserm, U974 / CNRS, Umr7215

G.H. Pitié-Salpêtrière - Bâtiment Babinski
47-83, bld de l'hôpital - 75651 Paris cedex 13, France

Expansion de triplets CTG et arrêt prolifératif précoce des myoblastes DM1

La dystrophie myotonique de type I est la pathologie neuromusculaire la plus répandue chez l'adulte. Elle est caractérisée par une atteinte multisystémique plus ou moins prononcée en fonction de l'extension des répétitions CTG, mutation à l'origine de l'atteinte. Le muscle squelettique est particulièrement touché avec un phénomène de myotonie ainsi qu'une atrophie. Les myoblastes, à l'origine de la formation des muscles et de leur régénération potentielle, présentent, chez les patients DM1, une capacité proliférative limitée par rapport à des myoblastes issus d'individus sains. C'est l'activation précoce de la voie p16 qui est à l'origine de cette sénescence prématurée des cellules DM1. Les mécanismes conduisant à ce phénotype sont néanmoins inconnus. Au cours de cette étude, nous avons tenté de décrypter une partie de ces mécanismes et notamment les liens potentiels entre les expansions CTG, la sensibilité au stress oxydatif et l'activation précoce de la voie p16 conduisant à la sénescence des myoblastes DM1.

Mots clés : myoblastes, expansions, dystrophie, stress oxydatif, p16, capacité proliférative.

CTG expansion and early proliferative arrest of DM1 myoblasts

Myotonic Dystrophy type I is the most common neuromuscular pathology at adult age. DM1 is characterized by a multisystemic but variable phenotype, correlated with the size of the CTG expansion. Skeletal muscle tissue is particularly affected showing myotonic symptoms and atrophy. Myoblasts, responsible for skeletal muscle growth and repair, present in DM1 patients a reduced proliferative capacity compared to cells isolated from non-affected individuals. During a previous study, p16^{INK4A} was identified as the trigger of this abnormal proliferative arrest in DM1 myoblasts, but mechanisms activating this pathway are still unknown. In this study, we attempted to decrypt these mechanisms, particularly the potential links between CTG expansions, oxidative stress sensitivity and early activation of the p16 pathway leading to myoblasts senescence.

Key words: myoblasts, expansions, dystrophy, oxidative stress, p16, proliferative capacity

Remerciements :

En commençant mon master 2, je n'avais qu'une très vague idée de ce qu'est la vie de laboratoire. Au cours des années, allant de mon stage de M2 à maintenant, de nombreuses personnes m'ont permis de me sentir bien dans ce laboratoire. Parmi celles-ci, je souhaite tout particulièrement remercier Gillian, la première personne que j'ai eu à rencontrer en postulant au labo. En plus de m'avoir permis de réaliser mon stage de M2 au sein du laboratoire, sa gentillesse et sa simplicité, m'ont immédiatement rassuré et mis en confiance.

Je tiens aussi à remercier Vincent, dit Maurice, dont le franc parlé n'a d'égal que la patience. Sans son appui je n'aurais probablement pas eu la possibilité de réaliser ma thèse.

Evidemment, je remercie profondément Denis alias Fufu, mon cher directeur de thèse, sans qui ce travail n'aurait pu se faire. Merci d'avoir été aussi patient avec moi (c'est peu de le dire...), de m'avoir guidé tout au long de ma thèse et de m'avoir permis d'assister à de nombreux congrès.

Merci à Anne (la Bigotte) de m'avoir encadré et soutenu au cours de mon stage de M2 et même après. Ce fut un plaisir d'apprendre à manipuler à tes côtés.

Je tiens également à remercier Virginie « Junior » pour toute l'aide et les conseils qu'elle a pu m'offrir. Je n'oublierai pas les bons délires qu'on a pu avoir.

Un très grand merci à Arnaud Klein, le voisin de bureau et collègue idéal. Sans tes conseils, ton soutien et ton aide, j'aurais eu beaucoup de mal à terminer ce travail.

Merci beaucoup à Camille, Soraya et Arnaud J., respectivement les pro des western blots, de la culture cellulaire et des TRF, et de la construction de plasmides.

Un grand merci à Kamel, le Maître des myoblastes. Merci pour ta bonne humeur, tous les conseils que tu as pu me donner et pour les (quelques) gueulantes que tu as poussé et pour avoir toujours été là quand j'avais besoin d'un coup de main.

Je n'oublie pas Lidia, sans qui le labo aurait bien du mal à tourner comme il faut. Si tu as un problème d'ordi, tu sais que tu peux toujours compter sur moi.

Je remercie également beaucoup Capucine qui, en plus de me donner de nombreux conseils concernant les manips et la gestion d'autres affaires (sur lesquelles je ne m'étendrai pas...), avait toujours les mots pour me remotiver.

Un grand merci à Elisa, la reine des immunos et du tiramisu, et à Marie-Catherine, la plus bretonne des danoises. Vos coups de main et vos conseils m'ont été très utiles.

Je souhaite également remercier Julie pour ces conseils avisés et sa capacité à détendre l'atmosphère du bureau certains soirs (qui a parlé de soupe de champagne ???).

Merci à toutes celles et tous ceux qui arpentent le chemin périlleux de la thèse : Alice, Jessica, Theresa, Marie-Elodie, Laetitia, Coralie, Maxime, Denis. La seule chose que je peux vous dire c'est « Bon courage, ne lâchez rien ! ».

Merci à toutes celles et ceux qui m'ont aidé et soutenu : Bod, Cyril, Anne, Khadija, Isabelle et les autres.

Merci à toutes et tous d'avoir supporté mon caractère de cochon et mon côté « légèrement » râleur...

Je souhaite sincèrement remercier l'association des Anciens de l'université Pierre et Marie Curie, et plus particulièrement Mr Jean-Claude Boucaut, pour toute l'aide et le soutien qu'ils m'ont apporté.

Je remercie également l'Institut de Myologie ainsi que Mr Thomas Voit, de m'avoir donné les moyens de finaliser mon étude.

Je tiens évidemment à remercier messieurs Bertrand Friguët, Guillaume Bassez, Nicolas Sergeant et Onnik Agbulut d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement ma mère sans qui rien n'aurait été possible, ainsi que ma Virginie, qui me soutient depuis deux ans maintenant.



Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS -----	13
INTRODUCTION -----	19
I. LE MUSCLE SQUELETTIQUE -----	23
I.1. GENERALITES SUR LE MUSCLE SQUELETTIQUE-----	23
a. <i>Origine embryonnaire des précurseurs du muscle</i> -----	23
b. <i>Voies moléculaires et engagement dans la voie myogénique</i> -----	24
c. <i>Structure du muscle squelettique</i> -----	27
d. <i>Structure des fibres musculaires</i> -----	27
e. <i>Structure des myofibrilles</i> -----	28
I.2. REGENERATION MUSCULAIRE ET CELLULES SATELLITES-----	30
a. <i>Cellules satellites : définition</i> -----	30
b. <i>Activation des cellules satellites</i> -----	31
c. <i>Devenir des cellules satellites activées</i> -----	33
d. <i>Différenciation des myoblastes</i> -----	35
e. <i>La fusion des myoblastes</i> -----	36
f. <i>Modèle in vitro de cellules satellites</i> -----	37
II. CAPACITE PROLIFERATIVE ET ACTEURS DU CYCLE CELLULAIRE -----	41
II.1. CAPACITE PROLIFERATIVE DES CELLULES SATELLITES -----	41
a. <i>Capacité proliférative</i> -----	41
b. <i>Le cycle cellulaire : les cyclines</i> -----	43
c. <i>Le cycle cellulaire : les kinases dépendantes des cyclines (CdK)</i> -----	46
d. <i>La régulation de l'activité des CdK</i> -----	47
e. <i>Le rôle de la protéine du Rétinoblastome</i> -----	48
II.2. LES INHIBITEURS DES KINASES DEPENDANTES DES CYCLINES (CKI) -----	49
a. <i>Les inhibiteurs CIP/KIP</i> -----	50
b. <i>Les inhibiteurs INK4</i> -----	52
III. LA SENESCENCE REPLICATIVE -----	59
III.1. GENERALITES-----	59
a. <i>L'arrêt prolifératif</i> -----	59
b. <i>La résistance au processus d'apoptose</i> -----	60
c. <i>Les modifications morphologiques</i> -----	61
d. <i>Les modifications métaboliques</i> -----	62
III.2. LA VOIE « TELOMERES DEPENDANTE »-----	62
III.3. LA VOIE P16 ^{INK4A} -----	64
a. <i>Locus INK4A/ARF (CDKN2A)</i> -----	64
b. <i>Mécanismes d'activation de la voie p16</i> -----	66

III.4.	INDUCTION DE LA SENESCENCE PAR UN STRESS -----	69
a.	<i>Modification du taux d'oxygène dans les cultures</i> -----	69
b.	<i>Addition de substances oxydantes au milieu de culture</i> -----	69
IV.	LE STRESS OXYDATIF -----	73
IV.1.	GENERALITES SUR LE STRESS OXYDATIF-----	73
IV.2.	STRESS OXYDATIF ET VOIES MOLECULAIRES -----	74
V.	LA DYSTROPHIE MYOTONIQUE TYPE I -----	83
V.1.	GENERALITES ET SYMPTOMATOLOGIE-----	83
a.	<i>Généralités</i> -----	83
b.	<i>Les différentes formes de DM1</i> -----	85
c.	<i>Mutation et mécanismes moléculaires</i> -----	86
d.	<i>Conséquences de la mutation</i> -----	88
V.2.	LES DIFFERENTS MODELES MURINS DE DM1 -----	95
V.3.	DYSTROPHIE MYOTONIQUE DE TYPE 1 ET CELLULES SATELLITES-----	97
a.	<i>Sénescence prématurée des myoblastes dans la DM1</i> -----	97
b.	<i>Implication de la voie télomères dépendante ?</i> -----	99
c.	<i>Implication de la voie p16-INK4a</i> -----	99
d.	<i>Augmentation de la perte télomérique</i> -----	100
V.4.	DM1 ET SENSIBILITE AU STRESS OXYDATIF -----	101
	OBJECTIF DE L'ETUDE -----	103
	MATERIELS & METHODES -----	107
	RESULTATS -----	119
I.	MYOBLASTES DM1 & SENSIBILITE AU STRESS OXYDATIF -----	123
I.1.	LA CAPACITE PROLIFERATIVE DES CELLULES DM1 EST MODULEE EN FONCTION DE L'ENVIRONNEMENT OXYDATIF. -----	123
I.2.	LES CELLULES DM1 ONT UN NIVEAU BASAL DE ROS ANORMAL -----	125
I.3.	ACTIVATION PRECOCE DE LA VOIE P16 ET ENVIRONNEMENT OXYDATIF-----	126
I.4.	AUF1 : UN FACTEUR DE REGULATION DE P16 ? -----	127
I.5.	UNE REGULATION DE LA TRADUCTION DE P16 PAR miR-24 ?-----	128
I.6.	LIEN ENTRE STRESS OXYDATIF ET ACTIVATION DE P16. -----	130
a.	<i>Conditions d'induction d'un stress oxydatif par le H₂O₂</i> -----	130
b.	<i>Activation de p16^{INK4A} par un stress oxydatif</i> -----	131
I.7.	REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DE P16 ^{INK4A} SUITE A UN STRESS OXYDANT -----	133
I.8.	REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA VOIE P16 ^{INK4A} -----	134
a.	<i>Protéine Kinase C</i> -----	134
b.	<i>L'implication de Erk 1/2</i> -----	135
c.	<i>p38</i> -----	137

II.	DEVELOPPEMENT D'UN MODELE DM1 INDUCTIBLE-----	141
II.1.	CARACTERISATION DU MODELE CELLULAIRE DM1 INDUCTIBLE-----	141
a.	<i>Construction de l'outil</i> -----	141
b.	<i>Tests préliminaires</i> -----	143
c.	<i>Caractérisation du modèle inductible.</i> -----	144
II.2.	CONSEQUENCES DE L'EXPRESSION DES REPETITIONS CTG-----	147
a.	<i>Répercutions sur le statut redox des cellules</i> -----	147
b.	<i>Modulation de l'expression de 16^{INK4A}</i> -----	148
c.	<i>Activation des MAPKinases</i> -----	149
II.3.	UTILISATION DE CET OUTIL DANS LA MISE EN EVIDENCE DU ROLE DE P68 DANS LA MODULATION DE L'ACTIVITE DE MBNL1. -----	151
a.	<i>p68 est impliqué dans la physiopathologie de la DM1</i> -----	151
b.	<i>Rôle de p68 dans la fixation de MBNL1 aux répétitions CUG</i> -----	151
III.	EXPRESSION DE REPETITIONS CTG INTERROMPUES DANS LE MUSCLE----	155
III.1.	BUT ET METHODES-----	155
III.2.	DETECTION DE FOCI NUCLEAIRES -----	156
III.3.	IMPACT SUR L'EPISSAGE ALTERNATIF -----	157
III.4.	REGENERATION INTENSIVE-----	158
	DISCUSSION-----	161
	CONCLUSION & PERSPECTIVES -----	173
	REFERENCES -----	177
	ANNEXES-----	203

Liste des abréviations

AAV	Virus associés aux adénovirus
ARF	Alternative open Reading Frame
ARN-CUGexp	ARN contenant de grandes expansions CUG
ARNm	ARN messenger
AUF1	AU-Rich Factor
ASK1	Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
BIN1	Bridging INtegrator 1 = amphiphysin II
BSA	Albumine Sérique Bovine
CDK	Kinases Dépendantes des Cyclines
CDKI	Inhibiteurs des Kinases Dépendantes des Cyclines
cDM1	forme congénitale de la Dystrophie Myotonique de type I
CELF1	CUGBP Elav-like family member 1
CIP	CdK Inhibitor Protein
CNBP	CCHC-type zinc finger nucleic acid binding protein
CUGBP1	CUG RNA-binding protein
(CUG) _{exp}	expansions CUG
Da	Dalton
DCF	2', 7'-dichlorofluorescéine
DMB	Dystrophie Musculaire de Becker
DMD	Dystrophie Musculaire de Duchenne
DM1	Dystrophie Myotonique de type I ou Steinert
DM2	Dystrophie Myotonique de type 2
DMPK	Dystrophie Myotonique Protéine Kinase
Dox	Doxycycline
Erk	Extracellular signal-Regulated Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FISH	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
GFP	Green Fluorescent Protein
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HDAC	histones déacétylases
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HSA	Human Skeletal Actin
HSP	Heat Shock Protein

hTERT	human Telomerase Reverse Transcriptase
HuR	Hu RNA Binding Protein
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	InterLeukine
INK4	Inhibitor of Cdk4
JNK	Jun-N-terminal Kinase
KIP	Kinase Inhibitor Protein
MAPKinase	Mitogen Activated Protein Kinase
MBNL1	MuscleBlind-Like 1
MDA	malondialdehyde
MEF	Myocyte Enhancer Factor
MEK	MAP/Erk Kinase
MHC	Myosin Heavy Chain
miRNA	micro ARN
MMR	MisMatch Repair
MRF	Myogenic Regulator Factor
MST1	Major Tumor-Suppressor Locus
MSTN	Myostatine
MyoNN	Myosine néo-natale
MYPT1	Myosine phosphatase
O/N	Over Night
pdb	paires de bases
PKC	Protéine Kinase C
PLC	PhosphoLipase C
pRb	protéine du Rétinoblastome
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
ORF	Open Reading Frame
RBP	RNA Binding Protein
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SIPS	Sénescence Induite Prématurément par le Stress
siRNA	small interfering RNA

SIX5	<i>Sine oculis</i> homeobox gene 5
SOD	Super Oxyde Dismutase
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TA	<i>Tibialis anterior</i>
t-BHP	tert-butylhydroperoxide
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNNT2	Troponine T cardiaque
TP	Température de Paillasse
TRF	Telomere Restriction Fragments
UTR	Untranslated Region. Région transcrite mais non traduite
ZN9	Zing Finger Protein 9

Introduction

Partie 1

Le muscle squelettique

I. Le muscle squelettique

I.1. *Généralités sur le muscle squelettique*

a. Origine embryonnaire des précurseurs du muscle

C'est à partir du dermomyotome que sont issues la plupart des cellules qui vont composer les différents muscles squelettiques des vertébrés. Celui-ci correspond au domaine dorsal des somites et peut être subdivisé en différents territoires. Les cellules du territoire ventrolatéral (hypaxial) vont être à l'origine de la formation des muscles de la ceinture abdominale, intercostaux ventraux et latéraux et des muscles des membres, alors que les cellules du territoire dorsomédial (épaxial) vont former les muscles intercostaux dorsaux et les muscles dorsaux.

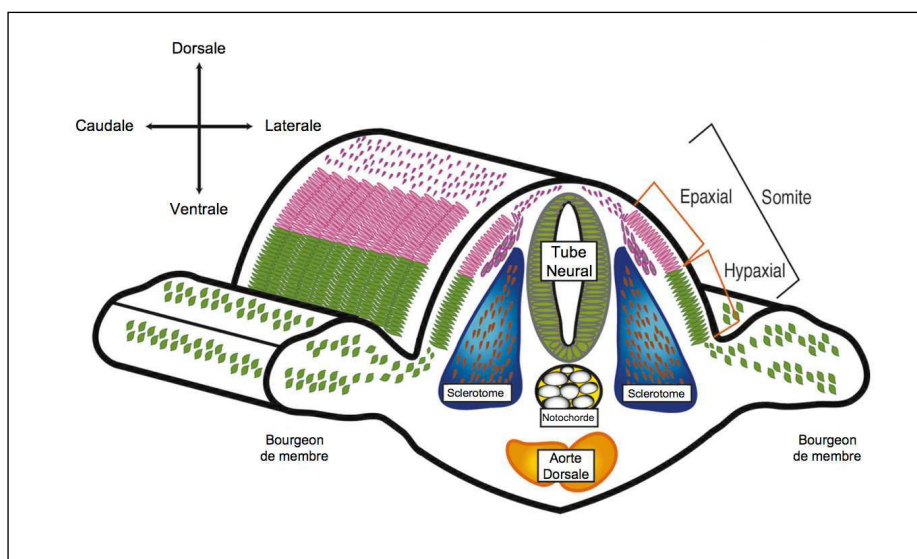


Figure 1 : Représentation schématique d'une coupe d'embryon

Les cellules issues des somites vont coloniser différents territoires de l'embryon afin de former des types de muscles spécifiques en fonction de leur localisation. (d'après Hawke and Garry 2001)

b. Voies moléculaires et engagement dans la voie myogénique

Plusieurs familles de facteurs de transcription permettent le contrôle de l'engagement des cellules dans la voie myogénique. La famille des MRFs (Myogenic Regulatory Factor), contenant les facteurs de transcription MyoD (Myf3), Myf5, Myf4 (Myogénine) et MRF4 (Myf6 ou herculine), a été la première identifiée. Ces différents facteurs sont caractérisés par la présence d'un domaine central bHLH (basic Helix-Loop-Helix), impliqué à la fois dans les interactions protéine-protéine (formation d'homodimères ou d'hétérodimères avec des co-facteurs comme E12 et E47), mais également dans des liaisons à l'ADN sur des séquences consensus CANNTG (boîte E). On retrouve ce type de séquences au niveau de régions régulatrices de nombreux gènes musculaires. On peut citer, entre autres, les gènes de la créatine kinase, des chaînes légères de myosine, de la troponine I, de la tropomyosine, de la vimentine ou encore de la desmine. Les MRFs sont donc des marqueurs caractéristiques des cellules musculaires. Chacun de ces quatre facteurs myogéniques est capable d'activer le programme de différenciation du muscle squelettique lorsqu'il est exprimé dans différents types de cellules non-musculaires (Tapscott, Davis et al. 1988; Braun, Buschhausen-Denker et al. 1989; Choi, Costa et al. 1990). Par exemple, l'expression forcée de MyoD, provoque une conversion de cellules non-myogéniques en cellules musculaires (Weintraub, Tapscott et al. 1989; Weintraub, Davis et al. 1991). Cependant, les différents MRFs possèdent des fonctions propres. De manière générale, Myf5 et MyoD sont impliqués dans l'engagement des cellules vers la voie myogénique, alors que MRF4 et myogénine sont des acteurs clés de la différenciation des cellules musculaires (Hawke and Garry 2001) (*figure 2*), bien que MRF4 puisse aussi être impliqué dans la détermination (Kassar-Duchossoy, Gayraud-Morel et al. 2004).

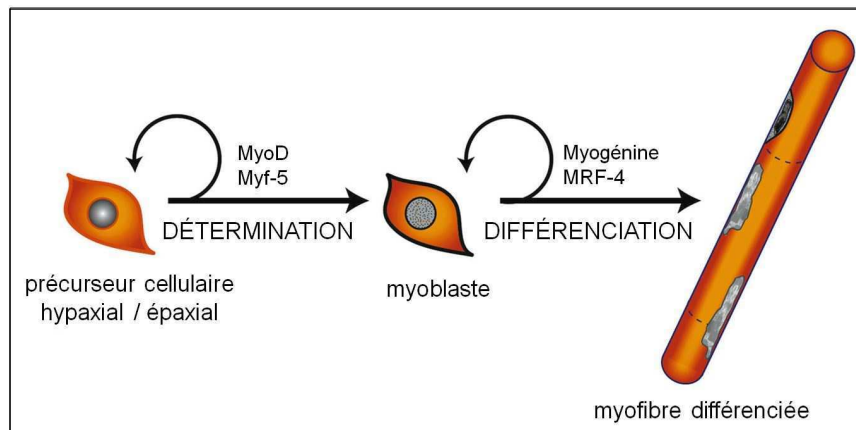


Figure 2 : Rôle des différents facteurs dans la myogénèse des cellules musculaires

L'expression des facteurs MyoD et Myf-5 permet l'engagement des précurseurs cellulaires vers la voie myogénique. La myogénine et les facteurs MRF-4 vont, quant à eux, intervenir dans la différenciation terminale des myoblastes en myofibre. (d'après Hawke and Garry 2001 pour une revue)

Des invalidations ciblées des différents gènes de cette famille chez la souris, ont permis d'en déterminer les fonctions précises. Dans le cas de Myf5 et MyoD, l'invalidation de l'un de ces deux gènes chez la souris ne perturbe pas le développement du tissu musculaire. Un phénomène de compensation entre Myf5 et MyoD a été proposé, car l'absence de ces deux gènes, de façon simultanée, aboutit à une absence totale de myoblastes et de fibres musculaires (Rudnicki, Schnegelsberg et al. 1993). En revanche, le défaut de régénération observé dans le muscle de souris adultes en absence de MyoD, démontre le rôle central de MyoD dans le processus de régénération musculaire (Montarras, Lindon et al. 2000). L'invalidation du gène de la myogénine n'entraîne pas de modifications morphologiques chez les embryons à 10,5 jours de développement, stade auquel la myogénine commence à être exprimé en temps normal. Des anomalies apparaissent vers 15,5 jours de développement avec une réduction notable des tissus musculaires. Chez la souris, l'augmentation du nombre de fibres musculaires a lieu vers 14,5 jours de développement et correspond à la myogénèse secondaire. L'absence de myogénine ne semble pas engendrer de perturbation de la myogénèse primaire, mais va avoir pour conséquence une altération de la myogénèse secondaire. Cependant, il n'est pas exclu que l'absence de myogénine dans la première phase ne soit pas compensée par MyoD et/ou Myf5, à l'inverse de la myogénèse secondaire (Venuti, Morris et al. 1995), suggérant un rôle de la myogénine dans la formation des fibres secondaires, mais aussi primaires. L'invalidation de MRF4 donne des résultats variables selon le modèle utilisé. Son absence pourrait notamment être compensée par la myogénine (Zhang, Behringer et al. 1995). En plus de son implication dans la différenciation terminale, il serait

susceptible d'intervenir dans la détermination des précurseurs myogéniques (Kassar-Duchossoy, Gayraud-Morel et al. 2004).

D'autres familles de facteurs de transcriptions comme MEF2, Six et Pax, sont également des acteurs importants de la myogenèse. La famille MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) fait partie de la super-famille MADS (MCM1 Agamous Deficient and Serum response factor) dont le domaine MADS permet à la fois une liaison à l'ADN ainsi qu'une dimérisation des protéines. Les facteurs MEF2 possèdent une séquence conservée de 29 acides aminés, responsable de la dimérisation ainsi que de leur fixation spécifique à des séquences riches en A/T que l'on retrouve dans de nombreux gènes musculaires tels que la créatine kinase, les chaînes lourdes de myosine, la desmine et certains MRFs (Ludolph and Konieczny 1995). En cas de surexpression au sein de cellules non myogéniques, les protéines MEF2, tout comme les MRFs, sont en mesure d'amorcer la myogenèse (Kaushal, Schneider et al. 1994).

Dans la famille des protéines Six, l'inactivation de Six 1 et 4 chez la souris a pour conséquences d'importants défauts au cours de la myogenèse (Grifone, Demignon et al. 2005). Six 1 a en particulier été démontrée comme indispensable à l'expression de MyoD ainsi qu'à la formation des bourgeons de membres (Laclef, Hamard et al. 2003). De plus, Six 1 et 4 sont indispensables à la régulation de facteurs myogéniques comme Pax 3, MRF4 ainsi que celle de la myogénine (Grifone, Demignon et al. 2005). Les co-facteurs de Six 1 et 4, respectivement Eya 1 et 2, ont également un rôle clef dans la formation des muscles (Grifone, Demignon et al. 2007).

Enfin, les facteurs de transcription Pax 3 et Pax 7 ont été montrés comme ayant un rôle dans la prolifération et la migration des précurseurs myogéniques dans les membres, et la spécification des cellules satellites. L'inactivation de Pax 3 chez la souris, entraîne une absence de muscles au niveau des membres, tout comme l'absence d'HGF (Hepatocyte Growth Factor) ou de c-met, dont l'expression est régulée par Pax 3 (Buckingham, Bajard et al. 2003). C-met est un récepteur tyrosine kinase interagissant avec son ligand naturel (HGF), qui contribue au processus de délamination ainsi qu'à la migration des cellules progénitrices du muscle. L'inactivation de Pax7 a pour conséquence une létalité importante des souris durant les deux premières semaines de vie. L'analyse des souris ayant survécu à l'absence de Pax7, a révélé qu'à l'âge adulte, celles-ci ne présentaient aucune cellule satellite au niveau du muscle (Seale, Sabourin et al. 2000). Pax7 serait indispensable à la spécification des cellules

progénitrices du muscle, mais également à leur survie. En effet, l'absence de Pax7 provoque une mort progressive des cellules satellites chez l'adulte, suggérant une activité anti-apoptotique de Pax 7 dans ces cellules (Relaix, Montarras et al. 2006; Buckingham 2007).

c. Structure du muscle squelettique

Le muscle squelettique représente environ 40% du poids d'une personne adulte. L'insertion des muscles sur les os se fait par l'intermédiaire de tendons, dans le prolongement des gaines conjonctives : l'endomysium des fibres, le périmysium des faisceaux de fibres et l'épimysium entourant le muscle (*figure 3*). Les tendons vont conférer une certaine élasticité au muscle, mais également permettre le maintien de la structure musculaire au repos, et la transmission de force lors de la contraction. Le muscle possède un réseau capillaire important permettant l'apport de nutriments ainsi que l'évacuation des déchets, mais également sa thermorégulation, l'apport d'oxygène, etc... Le tissu musculaire est composé majoritairement de cellules multinucléées et post-mitotiques de grande taille, correspondant aux fibres musculaires. En périphérie de ces dernières, on retrouve des cellules mononucléées qui, de par leur position, sont appelées cellules satellites et correspondent aux cellules progénitrices du muscle.

d. Structure des fibres musculaires

Les fibres musculaires sont regroupées en faisceaux de fibres pouvant atteindre des tailles de plusieurs centimètres et dont le diamètre est d'environ 50 μm . Elles sont caractérisées par une striation due à la présence de myofibrilles arrangées de manière bien structurée. Elles sont constituées de filaments fins d'actine ainsi que de filaments épais de myosine, le tout entouré d'un réseau membranaire de réticulum sarcoplasmique, formant une structure de 1 à 2 μm de diamètre. Ce réseau tient son nom du fait de son accollement à un réseau membranaire dérivé du sarcolemme, correspondant à des invaginations profondes de la membrane plasmique formant les tubules transverses (tubules T). Chaque fibre musculaire est innervée par un motoneurone unique (innervation monosynaptique), un même neurone

moteur pouvant innerver plusieurs fibres. Un groupe de fibres innervées par le même motoneurone, correspond alors à une unité motrice.

e. Structure des myofibrilles

Les fibres musculaires présentent deux types de striations, l'une correspondant aux myofilaments, et l'autre, perpendiculaire à la première, à l'organisation des protéines en sarcomères, ces derniers correspondant aux unités anatomo-fonctionnelles des myofibrilles.

Un sarcomère est délimité par deux stries Z et mesure de 2 à 3 μm de long. Il est composé principalement de filaments d'actine et de myosine dont le chevauchement correspond à une bande sombre, dite bande A (pour anisotrope). La bande I (pour isotrope) correspond quant à elle, à une zone constituée uniquement de filaments d'actine et est séparée en deux par une strie Z. La bande A est également pourvue en son centre, d'une zone plus claire appelée zone H ne contenant pour sa part que des filaments épais de myosine. Cette dernière est également interrompue en son milieu par une ligne plus sombre, la ligne M.

Lors d'une contraction, le glissement des différents filaments les uns par rapport aux autres, va entraîner une modification de la longueur du sarcomère. On constate alors une diminution de la bande claire I, la bande Anisotropique conservant sa taille initiale. La contraction résulte du glissement des filaments d'actine et de myosine entrelacés, ce qui implique un phénomène de contraction puis de relaxation.

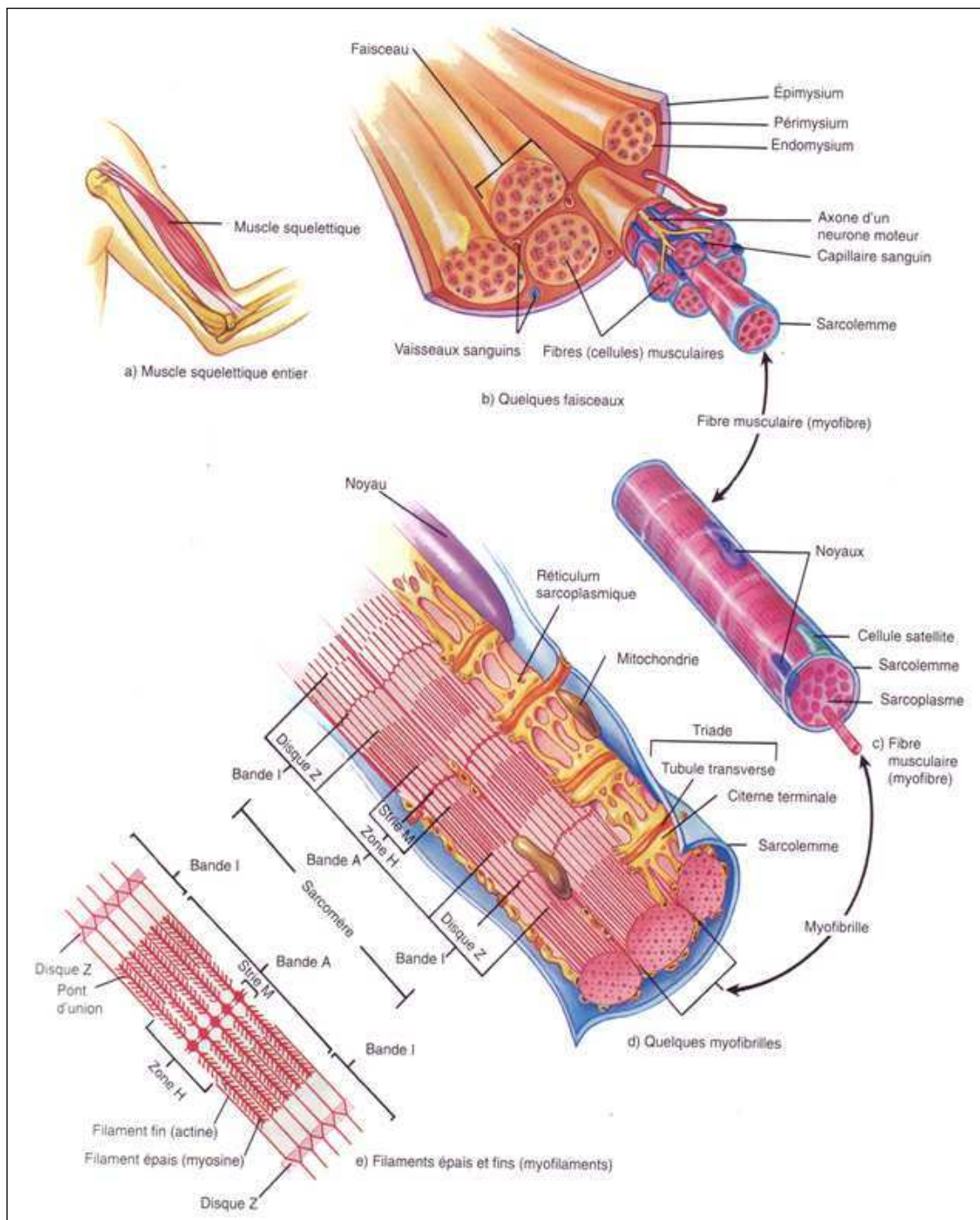


Figure 3 : Représentation schématique des différents niveaux de structures constituant le muscle squelettique (d'après Tortora, G.J. & al., 1994 pour l'ouvrage « Principes d'anatomie et de physiologie »)

I.2. Régénération musculaire et cellules satellites

a. Cellules satellites : définition

Comme leur nom l'indique, ces cellules sont situées en position satellite par rapport aux fibres musculaires. De façon plus précise, on les retrouve entre la membrane plasmique des fibres musculaires et la lame basale, préférentiellement à proximité des capillaires et des jonctions neuromusculaires. Dans un muscle au repos, on les retrouve dans un état quiescent, leur noyau étant caractérisé par un taux d'hétérochromatine important, et leur cytoplasme, par une taille réduite et un faible nombre d'organelles. Elles peuvent être activées en cas de lésion afin de régénérer le muscle. La morphologie des cellules va alors changer, avec notamment, une augmentation du volume de cytoplasme et du nombre d'organelles, ainsi que du taux d'euchromatine au sein des noyaux, correspondant à une sortie de l'état quiescent et à une première expression des facteurs de transcription Myf5 et MyoD (Cooper, Tajbakhsh et al. 1999). Il s'agit des seules cellules musculaires capables de retourner dans un état prolifératif et sont donc considérées comme les cellules souches du muscle. La capacité de croissance et de régénération du muscle est directement dépendante du nombre de cellules satellites disponibles, mais aussi de leur aptitude à être activée, proliférer et se différencier. Il est à noter que leur nombre varie selon l'âge ainsi que le type de muscle. Chez l'Homme, le taux de cellules satellites diminue avec l'âge, passant d'environ 4% chez un jeune adulte, à moins de 1% chez une personne âgée. Ce pool de cellules joue un rôle dans la croissance musculaire post-natale. En plus de leur localisation, différents marqueurs moléculaires permettent d'identifier les cellules satellites. Ainsi, l'expression de protéines de surface du type N-CAM ou CD34 ainsi que de facteurs de transcription tels que Pax7, Myf5, est utilisée pour mettre en évidence ces cellules, et leur état d'activation ou de quiescence est caractérisé par l'activation du gène MyoD (Hawke and Garry 2001; Charge and Rudnicki 2004; Holterman and Rudnicki 2005).

Les cellules satellites permettent la croissance ainsi que la régénération des fibres musculaires. Le phénomène allant de l'activation à la réparation ou la formation de nouvelles fibres suit un schéma bien défini. Lors d'une lésion musculaire, les cellules satellites quiescentes sont activées. On les appelle alors des myoblastes. Le processus de régénération musculaire est composé des étapes suivantes : la sortie de l'état de quiescence des cellules satellites, leur prolifération et leur fusion, soit entre elles, pour donner de nouvelles fibres, soit

avec des fibres endommagées afin de les réparer (Moss and Leblond 1970; Moss and Leblond 1971; Snow 1977; Snow 1978; Lipton and Schultz 1979; Darr and Schultz 1987). Les fibres néoformées ou réparées vont ensuite entrer dans un processus de différenciation et maturation. Une partie des cellules satellites activées va retourner en quiescence et recoloniser la niche de cellules souches afin de reconstituer le pool de cellules satellites (Zammit, Golding et al. 2004).

b. Activation des cellules satellites

Différents facteurs ont été décrits comme pouvant intervenir dans le processus d'activation des cellules satellites (*figure 4*). Des facteurs de la famille des Fibroblast Growth Factor, et notamment le FGF-2, voient leur expression augmentée de façon proportionnelle à l'importance de la lésion. De plus, l'expression de l'ARNm du récepteur au FGF est aussi fortement augmentée dans les heures suivant la lésion. *In vitro*, cette augmentation du récepteur entraîne un accroissement de la prolifération des myoblastes et limite leur différenciation. Au sein de la même famille, les facteurs FGF-1, -4, -6 et -9 seraient également impliqués dans le processus régénératif ainsi que dans l'activation et de la migration des cellules satellites (Charge and Rudnicki 2004; Armand, Laziz et al. 2006). D'autres facteurs trophiques sécrétés ont été mis en évidence comme pouvant jouer un rôle dans l'activation et la prolifération des cellules satellites lors du processus régénératif, notamment l'Insuline-like Growth Factor (IGF-1) (Edwall, Schalling et al. 1989; Levinovitz, Jennische et al. 1992; He, Vogelstein et al. 2008), la myostatine (MSTN) (Muller, Oma et al. 2005), ou encore le Leukemia Inhibitory Factor (LIF) (Kami and Senba 1998; Klein, Ebihara et al. 2008).

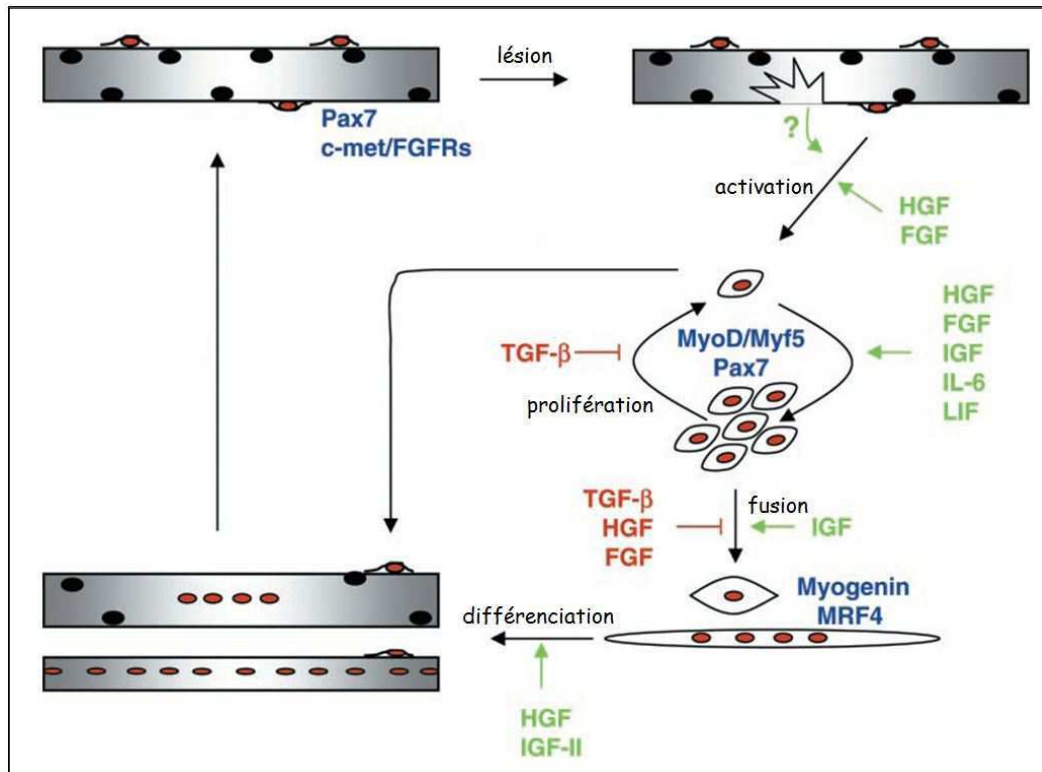


Figure 4 : Représentation schématique des facteurs impliqués dans la myogénèse.

De nombreux facteurs myogéniques sont impliqués dans les phases d'activation, de prolifération et de différenciation des cellules satellites. (d'après Charge and Rudnicki 2004)

De tous les facteurs de croissance étudiés, la capacité d'activation des cellules satellites quiescentes par l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) a été mise en évidence aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ce facteur de croissance est retrouvé dans le domaine extracellulaire des fibres musculaires lésées et son niveau d'expression est augmenté de façon proportionnelle à la lésion subie par le muscle, que ce soit suite à un dommage, un exercice ou un étirement mécanique. Il agit via les récepteurs c-met présents à la surface des cellules satellites quiescentes et activées (Allen, Temm-Grove et al. 1997; Cornelison and Wold 1997; Tatsumi, Anderson et al. 1998). L'HGF, hétérodimère d'environ 90kDa, favorise également la prolifération ainsi que la migration des myoblastes, tout en bloquant leur capacité à se différencier. Enfin, la présence de ce facteur induit une forte augmentation du niveau d'ARNm FGF dans les cellules. L'activation des cellules satellites est associée à une augmentation rapide de l'expression de MyoD et Myf 5 (Cooper, Tajbakhsh et al. 1999; Cornelison, Olwin et al. 2000; Zammit, Heslop et al. 2002), expression qui reflète un état activé des cellules satellites.

À la suite de leur activation, les cellules satellites vont quitter leur niche, et commencer à se diviser. L'activation des précurseurs myogéniques n'est pas restreinte au site de lésion, mais au contraire, s'étend sur l'ensemble de cette même fibre. Les cellules satellites activées co-expriment alors les facteurs Pax7 et les MRFs, MyoD et Myf5. La majorité de ces myoblastes va continuer à cycliser et se diviser avant de perdre l'expression de Pax7 et exprimer la myogénine, se différencier et fusionner. Parallèlement à cette population, une fraction des cellules satellites activées, et co-exprimant donc MyoD et Pax7, va sortir du cycle cellulaire pour reformer la population de cellules satellites quiescentes MyoD négatives (Olguin and Olwin 2004; Zammit, Golding et al. 2004).

c. Devenir des cellules satellites activées

Les cellules satellites activées ont la capacité de se diviser en deux populations distinctes. La majorité d'entre elles va proliférer puis s'engager dans une voie de différenciation/fusion afin de former de nouvelles fibres ou de réparer celles qui ont été lésées. Les autres vont reformer le pool de cellules satellites quiescentes et ainsi conserver la capacité régénérative du muscle. Deux mécanismes peuvent permettre aux cellules satellites activées de déterminer leur devenir au sein du muscle : une division symétrique ou asymétrique.

La division symétrique des cellules, représentant 90% des divisions opérées dans le muscle, fut décrite comme donnant naissance à deux cellules en contact avec la membrane basale. Les cellules filles pourraient alors se diriger soit vers la reconstitution du pool de cellules satellites, soit vers la voie de différenciation/fusion. Le suivi des cellules satellites activées à l'aide de marqueurs, montre que les cellules Pax7⁺/Myf5⁻ repartiront en quiescence alors que celles exprimant Pax7 et Myf5, se dirigeront vers la voie de réparation des fibres lésées (Kuang, Kuroda et al. 2007). Malgré tout, l'expression de Pax7 ne semble pas indispensable dans l'engagement des cellules satellites vers la voie de réparation des fibres. En effet, des travaux *ex-vivo* ont démontré que les cellules satellites perdant l'expression de Pax7, se dirigeaient préférentiellement vers la voie de différenciation (Zammit, Golding et al. 2004) (*figure 5*).

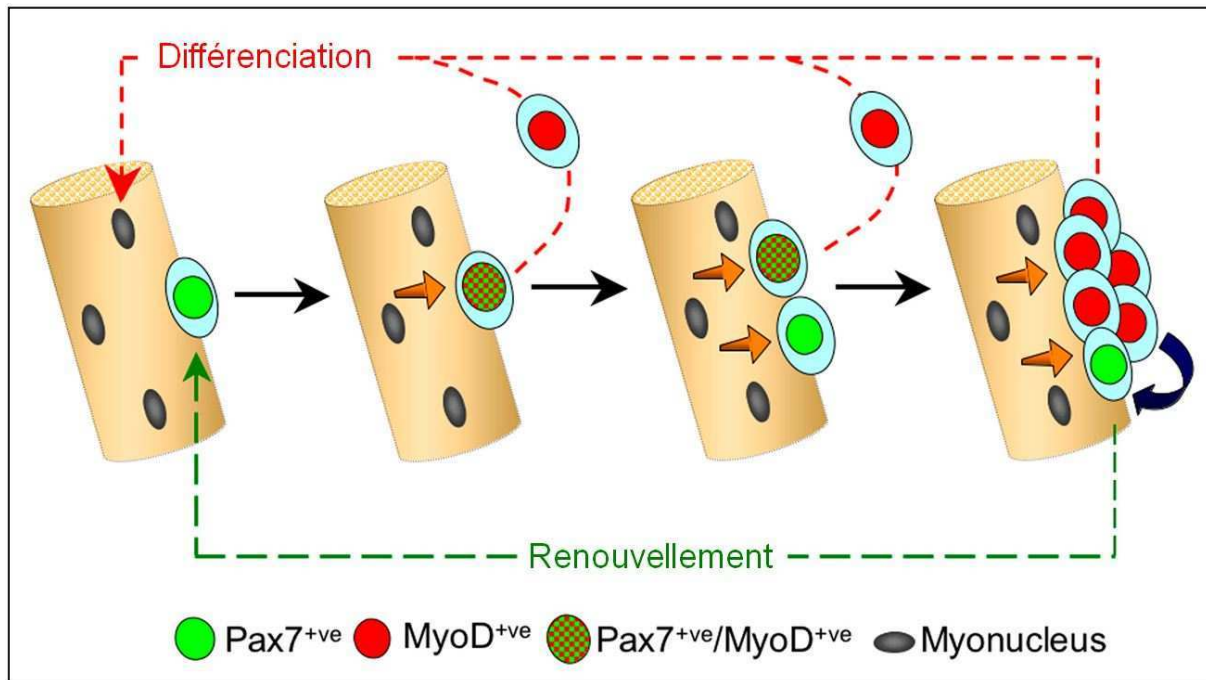


Figure 5 : Représentation schématique du mécanisme d'auto-renouvellement des cellules satellites

Une partie des myoblastes en prolifération et exprimant uniquement le facteur Pax7 va retourner en quiescence et permettre le renouvellement du pool de cellules satellites. (d'après Zammit, Golding et al. 2004)

L'autre mécanisme consiste en une division asymétrique des cellules. Ce type de division représenterait environ 10% des divisions réalisées au sein d'un muscle. Au cours de cette division, les deux cellules filles seraient perpendiculaires à la lame basale, et par conséquent, en contact avec des environnements différents : l'une avec le plasmalemme, l'autre conservant son interaction avec la membrane basale (Kuang, Kuroda et al. 2007). La cellule à proximité du plasmalemme présente des niveaux élevés de Myf5 lui permettant de différencier /fusionner avec la fibre proche, alors que l'autre cellule, exprimant préférentiellement Pax7, se dirigera vers un état de quiescence. Toutefois, si ce modèle est compatible avec l'activation des cellules satellites lors de la croissance du muscle, il est plus difficile à concevoir dans le cadre de la régénération après lésion, quand les divisions cellulaires se font alors que la fibre musculaire adjacente est dégénérée ou en dégénérescence. Le mécanisme déterminant le devenir des cellules lors d'une division asymétrique implique notamment la voie Notch, comme le montre la localisation de la protéine Numb (Conboy, 2002). Numb empêche la translocation vers le noyau du domaine intracellulaire de Notch lorsque celui-ci est clivé suite à une interaction avec l'un de ces ligands. Dans le cadre de la division asymétrique, le facteur Numb est distribué de façon asymétrique entre les deux cellules filles, prédestinant seulement l'une d'entre elles vers un retour en quiescence et un

maintien du pool de cellules progénitrices du muscle (Shinin, Gayraud-Morel et al. 2006). Parallèlement, il a été démontré que cette division asymétrique est associée à une ségrégation asymétrique du brin matrice de l'ADN vers les cellules prédestinées à reformer le pool de cellules réserves (Conboy, Karasov et al. 2007).

d. Différenciation des myoblastes

La différenciation des myoblastes est caractérisée d'une part, par une sortie irréversible du cycle cellulaire, et d'autre part, par une augmentation de l'activité transcriptionnelle de MyoD suivie d'une expression de Myogénine afin d'aboutir à l'expression de protéines muscles spécifiques comme les chaînes lourdes de la myosine (MHC). La protéine du Rétinoblastome (pRb) joue un rôle déterminant dans ce processus. En effet, en plus d'être un élément central dans le contrôle de la sortie du cycle cellulaire, la coopération entre pRb et MyoD stimule l'activité transcriptionnelle de MEF2, facteur également impliqué dans la transcription de gènes régulant la différenciation musculaire (Novitch, Spicer et al. 1999). Enfin, MyoD participe au maintien de pRb sous forme déphosphorylée et réciproquement, pRb contribue à l'activation de MyoD (Guo, Degenin et al. 2003).

D'autres régulateurs du cycle cellulaire ont également été impliqués dans les phénomènes inhérents à la différenciation des myoblastes. Ainsi il a été montré que la voie p53/p21 participe activement à ce processus. p53, dont l'expression est fortement augmentée lors des premières heures de différenciation (Halevy 1993), va induire sa cible directe, p21, dont l'expression augmente au cours des 96 premières heures de différenciation (Halevy, Novitch et al. 1995). Un autre inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (CdK) et du cycle cellulaire, p57, est aussi exprimée de façon très précoce lors de la différenciation (Bigot, Jacquemin et al. 2008). p57 est activé par p73 mais, comme p21, il peut être régulé de manière indépendante par MyoD (Halevy, Novitch et al. 1995; Vaccarello, Figliola et al. 2006). Les protéines p21 et p57 ayant le même type de fonction, leur invalidation individuelle n'affecte pas la formation des myotubes. À l'inverse, leur inhibition simultanée conduit à une perturbation de la myogénèse ainsi qu'à une augmentation de la capacité proliférative des myoblastes (Zhang, Wong et al. 1999). La capacité de p57 à inhiber les complexes CdK2/cycline E ainsi que son affinité avec MyoD, vont lui permettre de stabiliser cette

dernière (Reynaud, Pelpel et al. 1999; Reynaud, Leibovitch et al. 2000). Enfin, l'induction du programme de différenciation est aussi dépendante de la cycline D1. En effet celle-ci assure en phase de prolifération, le transport de CdK4 du cytoplasme vers le noyau, qui vient bloquer à son tour la protéine MyoD (Zhang, Wei et al. 1999). Ces différentes études soulignent le rôle déterminant des inhibiteurs du cycle cellulaire et de MyoD dans l'induction du mécanisme de différenciation des myoblastes dont l'un des événements précoces est la sortie irréversible du cycle cellulaire.

e. La fusion des myoblastes

Les cellules musculaires vont fusionner entre elles pour former des myotubes, cellules post-mitotiques multinucléées. Ce mécanisme nécessite des interactions cellulaires faisant intervenir notamment des protéines trans-membranaires calcium dépendantes : les cadhérines. La M-cadhérine est particulièrement importante pour la fusion des myoblastes, tant lors de la myogénèse qu'au cours de la régénération musculaire. Une expression très élevée de la M-cadhérine est d'ailleurs retrouvée au site de lésion du muscle (Moore and Walsh 1993). Sa régulation est en partie sous la dépendance de MyoD, et l'absence de MRF conduit à une forte réduction de l'expression de cette molécule d'adhésion (Sabourin, Girgis-Gabardo et al. 1999). La réduction du niveau de M-cadhérine a pour conséquence une diminution de la capacité de fusion des myoblastes, avec un index de fusion passant de 90 à 15%. Cependant, la M-cadhérine n'est pas totalement indispensable au processus de fusion, et son abolition dans un modèle murin ne perturbe pas la formation des muscles (Hollnagel, Grund et al. 2002). En l'absence de celle-ci, d'autres cadhérines comme la N- ou la R-cadhérine sont surexprimées afin de compenser le déficit en M-cadhérine. D'autres familles de molécules d'adhésion comme les intégrines, et plus particulièrement les intégrines $\alpha 3$ et $\beta 1$ (Brzoska, Bello et al. 2006), ainsi que les lectines, comme la galectine 1 (Goldring, Jones et al. 2002; Watt, Jones et al. 2004), participent également au mécanisme de fusion.

La régulation du flux calcique est un autre élément primordial pour le phénomène de fusion (Konig, Beguet et al. 2006). Ainsi, la présence des canaux calciques potassium dépendants Kir 2.1 à la surface des myoblastes humains, est essentielle à la fusion de ces derniers (Bernheim and Bader 2002). En permettant la sortie de potassium (K^+), ces canaux vont contribuer à une hyperpolarisation de la membrane. En réponse à cette dernière, un

influx de calcium (Ca^{2+}) dans les cellules conduit notamment à l'activation de la calcineurine qui vient induire l'expression de la myogénine et de MEF2 (Konig, Hinard et al. 2004).

f. Modèle *in vitro* de cellules satellites

Dans l'optique d'analyser les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la prolifération et la différenciation des myoblastes, le modèle de culture primaire de cellules musculaires a été développé. Pour cela, les cellules satellites peuvent être isolées à partir de biopsies musculaires de deux façons différentes : soit via une digestion enzymatique, soit via la technique dite d'explant (Blau and Webster 1981). Cette seconde technique exploite les capacités de migration des cellules satellites lors d'une lésion. En plaçant des fragments de biopsie en culture, les cellules progénitrices du muscle vont migrer hors de leur niche pour ensuite se diviser et proliférer. Elles sont alors considérées comme des myoblastes et sont capables de se diviser dans un milieu de culture supplémenté en sérum. Chaque souche de cellules ainsi isolées possède une capacité proliférative propre qui va dépendre en grande partie de l'âge du donneur. En effet, il a été constaté que le nombre de divisions qu'une souche de myoblastes est capable de réaliser, est inversement proportionnelle à l'âge du donneur sur lequel a été prélevée la biopsie (Mouly, Aamiri et al. 2005). Enfin, en l'absence de facteurs de croissance (déplétion en sérum), les myoblastes vont spontanément se mettre à différencier et fusionner entre eux afin de former des myotubes.

Partie II

Capacité Proliférative & acteurs

du cycle cellulaire

II. Capacité proliférative et acteurs du cycle cellulaire

II.1. Capacité proliférative des cellules satellites

a. Capacité proliférative

La vie proliférative des myoblastes isolés à partir de biopsies humaines passe par trois phases caractéristiques (*figure 6*). Dans un premier temps, les cellules s'acclimatent à leur milieu et prolifèrent très peu. Après ce temps de latence, les myoblastes entrent dans une phase exponentielle de croissance. Enfin, lors d'une dernière phase, on observe un ralentissement de la croissance des myoblastes jusqu'à un arrêt complet de ces cellules qui entrent en sénescence réplivative (Hayflick and Moorhead 1961). Le nombre de divisions à partir duquel les cellules vont atteindre cette phase de sénescence proliférative, est variable et dépend notamment de l'âge du donneur sur lequel a été prélevée la biopsie. Ainsi, des myoblastes issus d'individus jeunes, possèdent une capacité proliférative plus importante que celle de myoblastes issus d'individus âgés. Par exemple, des cellules satellites isolées d'un muscle de nouveau-né de 5 jours, ont une capacité proliférative d'environ 60 divisions, alors que celles issues d'une biopsie effectuée sur une personne âgée vont pouvoir se diviser une quinzaine de fois (Mouly, Aamiri et al. 2005). Par ailleurs, on constate que le potentiel prolifératif des cellules satellites est sensiblement équivalent entre des muscles ayant cessés de croître, c'est à dire entre un adulte jeune et âgé. Ces observations peuvent s'expliquer de par la nature même du tissu musculaire. En effet, celui-ci est constitué de fibres dont les noyaux post-mitotiques (myonuclei) proviennent de la fusion de myoblastes ayant eux-mêmes proliféré à partir de cellules satellites. Lors de la formation des muscles, les cellules satellites sont activées de façon importante afin de fournir assez de cellules pour assurer la croissance musculaire. Ceci va avoir pour conséquence une forte réduction de leur capacité proliférative au cours de l'enfance du donneur. À l'âge adulte, les muscles matures ayant atteint leur taille finale, les cellules satellites ne seront sollicitées que dans le cadre du renouvellement des myonuclei, ou en cas de lésion ou d'hypertrophie du muscle. Or le renouvellement des myonuclei chez l'adulte est faible, une étude ayant évalué leur « âge » à 15,1 ans chez des individus de 37 et 38 ans (Spalding, Bhardwaj et al. 2005). Leur potentiel prolifératif va donc se stabiliser et rester plus ou moins constant au cours de la vie adulte.

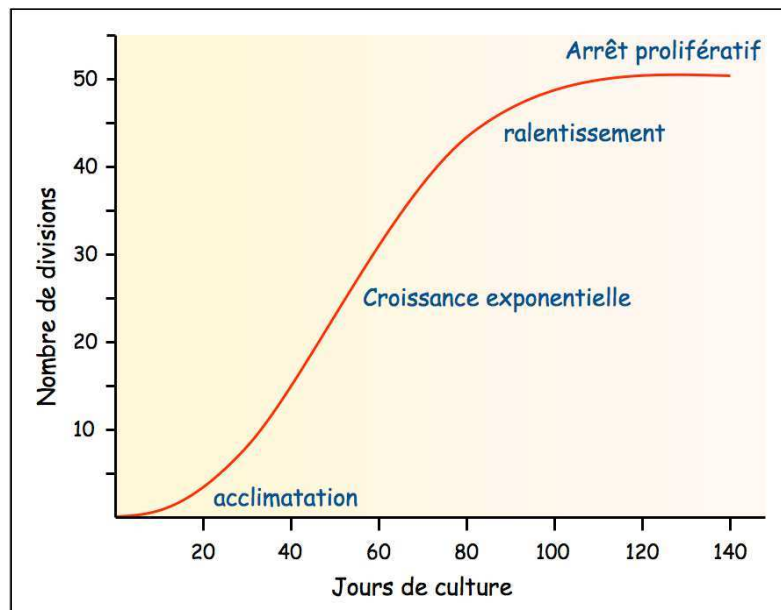


Figure 6 : Représentation des différentes phases de prolifération selon Hayflick

Les cellules non-immortalisées suivent ce schéma de prolifération aboutissant à leur arrêt prolifératif (sénescence). (d'après Shay and Wright 2000)

La capacité régénérative d'un muscle va être influencée par différents facteurs tels que le nombre de cellules satellites présentes au sein du muscle ainsi que la capacité d'activation, de prolifération et de différenciation de celles-ci (Renault, Thornell et al. 2002). Différents paramètres peuvent modifier le potentiel prolifératif des myoblastes isolés à partir de biopsies, comme des facteurs intrinsèques (mutations) ou extrinsèques (environnement, stress oxydatif). Ainsi, il a été démontré que des myoblastes issus de biopsies musculaires de rats et cultivés à des taux réduits d'oxygène (2% O₂), possèdent une capacité proliférative accrue par rapport à des myoblastes cultivés dans des conditions classiques (19% O₂) (Chakravarthy, Spangenburg et al. 2001; Csete, Walikonis et al. 2001). Dans le cas de certaines pathologies musculaires comme la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), il a également été constaté une diminution de la capacité proliférative des myoblastes DMD en comparaison de myoblastes issus d'individus sains du même âge. Des myoblastes isolés de muscles de patients DMD âgés de 7 et 11 ans vont respectivement être capable de réaliser 19 et 14 divisions quand des myoblastes issus d'individus non atteints, du même âge, vont être capables d'atteindre une trentaine de divisions. L'importante réduction du nombre de divisions possibles avant l'entrée en sénescence répllicative est due à un excès de cycles de dégénérescence/régénération au sein des muscles de ces patients. Ces cycles répétés de réparation des fibres par les cellules satellites ont pour conséquence un épuisement du pool de

ces cellules. Une fois ce stock de cellules progénitrices épuisé, le muscle est incapable de se régénérer (Decary, Hamida et al. 2000).

b. Le cycle cellulaire : les cyclines

Le cycle cellulaire se décompose en quatre phases, débutant par la phase G1 et allant jusqu'à la mitose. La phase G1 correspond à un état de préparation de la cellule vers le passage en phase S. Au cours de cette première phase, la cellule va croître et effectuer la plupart des régulations transcriptionnelles nécessaires à la synthèse des protéines indispensables à la suite du cycle. C'est préférentiellement lors de la phase G1 que les cellules vont pouvoir communiquer entre elles et exécuter leurs fonctions propres. La phase S est quant à elle dédiée à la duplication du matériel génétique de la cellule. La cellule ne pourra pas s'engager dans cette seconde phase si des erreurs sont présentes au niveau de la séquence d'ADN, et ce, du fait de la présence d'un point de contrôle à la fin de la phase G1. L'existence de ce checkpoint fut proposée par Pardee qui constatait que les cellules quiescentes, en G0, mettaient toutes le même temps à commencer la phase S (Pardee 1974; Pardee 1989). Avant ce point de restriction, les cellules ont besoin de divers facteurs de croissance qui empêchent le passage de ce checkpoint. Une fois celui-ci passé, ces facteurs ne sont plus indispensables. La phase G1 est également le point de sortie pouvant conduire la cellule vers la différenciation ou encore la sénescence. La phase S qui suit, va donc permettre un doublement du matériel génétique de la cellule. Au cours de la phase G2, différents mécanismes moléculaires vont vérifier l'intégrité de la cellule, notamment la duplication correcte du génome. A la fin de cette phase, un nouveau point de restriction est mis en place afin de garantir le passage de la cellule vers la phase de mitose dans des conditions optimales. Enfin, la dernière phase, qui correspond à la mitose, va permettre à la cellule de distribuer de façon équivalente le matériel génétique de la cellule mère à deux cellules filles. La mitose est scindée en 4 phases distinctes : Prophase, Métaphase, Anaphase et Télophase préparant la cellule à sa division terminale.

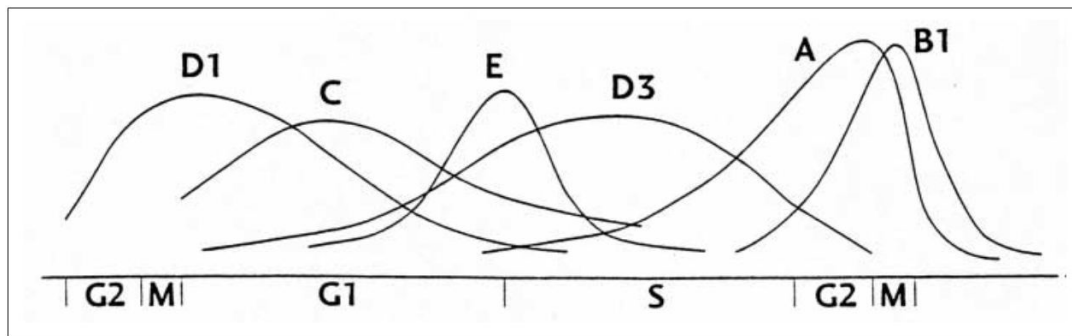


Figure 7 : Représentation schématique du taux des différentes cyclines au cours du cycle cellulaire (d'après Viallard, Lacombe et al. 2001)

Les quatre phases de ce cycle (G1, S, G2, mitose) suivent un déroulement ordonné bien défini et sont soumises à des processus moléculaires de régulation par des stimuli intra- et extracellulaires connus. Cette régulation du cycle cellulaire se fait via l'intervention de protéines Sérine/Thréonine Kinases : les CDK ou Cycline Dependent Kinase (Javelaud and Besancon 2002). Ces protéines peuvent être régulées par phosphorylation, mais également en s'associant à des molécules régulatrices dont l'expression va varier au cours du cycle cellulaire : les cyclines. Enfin, leur activité peut aussi être modifiée par l'intervention de CDKI (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor).

Le cycle cellulaire est régulé par les cyclines (*figure 7*). Ces dernières font partie d'une famille de protéines subissant des variations de leur taux au cours du cycle. Leur présence à des moments précis du cycle au sein de la cellule va permettre à cette dernière de passer d'une phase du cycle à l'autre. De plus, chaque type de cycline possède une affinité particulière à un ou deux types de protéines CDK. Elles sont classées selon 5 types (de A à E) et vont être présentes au sein de la cellule à différents moments du cycle cellulaire.

Les cyclines D vont être les premières à apparaître lors d'une stimulation par des mitogènes. Elles permettent le passage des cellules de la phase G1 à la phase S. En effet, la dégradation de ces cyclines avant que le point de restriction en G1 ne soit franchi, va empêcher la cellule de poursuivre son cycle cellulaire. De plus, leur activité catalytique va être dépendante de la présence de deux CDK majeures : CdK 4 et 6 (Bates, Bonetta et al. 1994; Matsushime, Quelle et al. 1994; Meyerson and Harlow 1994). Enfin, leur expression peut être induite par des facteurs de croissance comme FGF ou TGF- β .

La cycline E va, quant à elle, voir sa présence augmentée au cours de la phase G1 après la hausse du niveau de cycline D (Koff, Cross et al. 1991). Elle va pouvoir se lier à la CdK2 (Dulic, Lees et al. 1992; Koff, Giordano et al. 1992) et former un complexe qui va

participer à la phosphorylation de la protéine du Rétinoblastome (pRb) (Tsai, Lees et al. 1993; Hatakeyama, Brill et al. 1994), son pic d'activité se situant juste avant l'entrée des cellules en phase S. La surexpression de la cycline E entraîne une réduction de la durée de la phase G1, une diminution de la taille des cellules, ainsi qu'une diminution de leur dépendance face aux facteurs de croissance et enfin, prolonge la durée de la phase S (Resnitzky, Gossen et al. 1994; Ohtsubo, Theodoras et al. 1995). Le but de ce complexe protéique est donc de permettre la transition G1/S des cellules.

La cycline A va également être importante au moment de cette transition G1/S. Elle est alors complexée avec la CdK2 et sa surexpression conduit à une entrée prématurée des cellules en phase S (Rosenberg, Zindy et al. 1995). Comme la cycline E, le rôle de la cycline A est important au moment du passage de la phase G1 à la phase S mais à un niveau différent. Le complexe Cycline A/CdK2 se lie au facteur de transcription PCNA et permet à la cellule de débiter sa phase de réplication de l'ADN.

Il existe trois cyclines B. La mieux connue, la cycline B1, joue un rôle important dans les mécanismes de déclenchement de la mitose. En plus d'une régulation au cours du temps, il a été démontré que la cycline B1 subissait une régulation spatiale, c'est-à-dire que sa localisation au sein de la cellule va évoluer au cours du temps. Ainsi, le complexe cycline B1/CdK1 passe du compartiment nucléaire au compartiment cytoplasmique lors de l'interphase (Pines and Hunter 1991; Pines and Hunter 1994). Dans un deuxième temps, la cycline B1 devient nucléaire ce qui a pour conséquence une dégradation de l'enveloppe nucléaire du fait de l'action des complexes cyclines B1/CdK1 sur les lamines nucléaires. Les cyclines A et B sont considérées comme des cyclines mitotiques (malgré le rôle de la cycline A en phase G1/S). En effet, leur pic de présence dans les cellules se situe au cours de la phase mitotique et de plus, elles possèdent une séquence particulière d'acides aminés partiellement conservée en N-terminale, indispensable à leur destruction rapide nécessaire pendant la mitose.

c. Le cycle cellulaire : les kinases dépendantes des cyclines (CdK)

Les CdK sont au nombre de huit. Elles ont toutes en commun une séquence conservée dans leur partie N-terminale, correspondant à un domaine de liaison aux cyclines (Ducommun, Brambilla et al. 1991; Endicott, Nurse et al. 1994). De façon générale, leur expression va varier, mais leur niveau est toujours détectable au cours du cycle cellulaire.

CdK1 n'est présente que dans les cellules qui prolifèrent. L'ARNm codant pour CdK1 varie au cours du cycle mitotique avec notamment un niveau bas en phase G1 (Fisher and Morgan 1994). L'activité enzymatique de cette protéine n'est observée qu'au cours de la phase G2/M. CdK1 permet le passage de la phase G2 à la phase M. L'initiation de la mitose est dirigée de façon spécifique par une cascade de phosphorylation de protéines qui aboutit à l'activation du complexe cycline B1/CDK1 par phosphorylation de CdK1 (Ohi and Gould 1999). De plus, CdK1 peut tour à tour être complexée avec les cyclines A et B, respectivement au cours de la phase G2 et lors du passage G2/M.

CdK2 peut quant à elle, être activée par les cyclines A ou E (Pines and Hunter 1990; Demetrick, Zhang et al. 1994). La formation d'un complexe avec la cycline A aura lieu à la fin de la phase G1 et ce dernier restera jusqu'au moment de la métaphase, durant la mitose, lors de la dégradation de la cycline A. De son côté, le complexe Cycline E/CdK2 est présent à partir de la phase G1 jusqu'au début de la phase S, permettant la mise en route de la réplication de l'ADN (Tsai, Lees et al. 1993).

Les partenaires des CdK4 sont les cyclines D (Matsushime, Ewen et al. 1992). Au cours de la phase G1, le complexe CdK4/cycline D1 est actif. Cette activité connaît un pic au moment de la transition G1/S et reste détectable jusqu'à la mitose (Matsushime, Quelle et al. 1994). Son invalidation n'est pas létale, mais elle conduit, chez la souris, à une diminution de taille ainsi qu'à une stérilité et un diabète (Rane, Dubus et al. 1999). De plus, CdK4 possède de nombreux partenaires moléculaires, et notamment p16^{INK4A}.

Le cas de CdK5 est particulier puisqu'elle n'est pas activée par des cyclines (Sharma, Sharma et al. 1999). De plus, elle semble jouer un rôle particulièrement important dans le métabolisme cérébral.

Cdk6 est capable de former des complexes avec toutes les cyclines D et possède une activité kinase sur la protéine Rb. Cette activité est capable de se manifester au cours de la phase G1 (Meyerson and Harlow 1994).

Cdk7 possède une incidence indirecte sur la phosphorylation des histones H1. En effet, les Cdk7 sont-elles mêmes en mesure de phosphoryler les Cdk1, 2 et 4, modifiant ainsi leur activité vis à vis des histones H1. Cdk7 se lie à la cycline H, formant ainsi le complexe CAK (Cdk Activating Kinase). L'expression ainsi que l'activité de Cdk7 ne varie pas au cours du cycle cellulaire laissant penser qu'il existe un autre mécanisme que la régulation via les cyclines (Darbon, Devault et al. 1994).

Enfin, Cdk8 a pour partenaire la cycline C.

d. La régulation de l'activité des Cdk

Les Cdk peuvent être régulées de trois façons différentes :

- Leur liaison à une cycline
- Leur phosphorylation
- Leur liaison à une molécule tierce qui va pouvoir l'inhiber

Les Cdk possèdent une structure dite bilobaire. Au milieu de ces deux lobes se trouvent les sites de liaison à l'ATP ainsi qu'au substrat. Dans sa conformation inactive monomérique, une Cdk est liée à l'ATP et ainsi dans l'incapacité de se lier à un substrat. La liaison à une cycline entraîne un changement de conformation conduisant à une modification de l'orientation de l'ATP et à la libération du site de liaison au substrat. La formation du complexe Cdk/cycline n'est malgré tout pas suffisante pour activer ce complexe. C'est l'intervention du complexe CAK qui permet la phosphorylation de résidus particuliers sur celui-ci. Ces phosphorylations particulières permettent un dégagement du site catalytique de la Cdk, mais également une stabilisation du complexe. La phosphorylation d'une Cdk n'est pas forcément synonyme d'activation de cette dernière. Seule la phosphorylation de la Thréonine (160 ou 161) active les Cdk. A l'inverse, les phosphorylations touchant la Thréonine 14 ou la Tyrosine 15 conduisent à une inhibition des Cdk. L'activation des Cdk passe donc par la déphosphorylation de ces deux sites (Thr14 et Tyr15) via une phosphatase (CDC25), combinée à la phosphorylation des Thr160 ou 161 par des kinases telles que wee1, Myt1 ou encore Myk1.

e. Le rôle de la protéine du Rétinoblastome

La protéine du rétinoblastome (pRb) va principalement avoir pour rôle de réguler la progression du cycle cellulaire en phase G1 (Weinberg 1995). Elle agit au point de restriction, permettant ou empêchant la poursuite du cycle en phase S. Sous sa forme inactive, elle est hyperphosphorylée. Le passage du point de restriction, et donc la poursuite du cycle cellulaire, ne pourra s'effectuer que si pRb se trouve sous sa forme phosphorylée. Ce sont les complexes CdK/cycline (cycline D/CdK4 ou 6) qui permettent la phosphorylation de pRb, la rendant ainsi inactive et inhibant son activité anti-proliférative. Les cyclines D sont les seules capables d'interagir directement avec la protéine Rb (Dowdy, Hinds et al. 1993; Ewen, Sluss et al. 1993).

Au niveau moléculaire, pRb interagit avec les protéines de la famille E2F correspondant à une famille de facteurs de croissance. Sous sa forme déphosphorylée, pRb va ainsi pouvoir s'associer aux facteurs E2F, inhibant leur activité de transactivation des gènes nécessaires à la réplication de l'ADN. La phosphorylation de pRb en fin de phase G1, va entraîner la libération des facteurs E2F, permettant la poursuite du cycle cellulaire (Lukas, Parry et al. 1995; Suzuki-Takahashi, Kitagawa et al. 1995). Les protéines E2F sont des hétérodimères composés d'une molécule E2F (E2F-1 à 6) ainsi que d'une protéine de la famille DP (DP1 ou 2) (La Thangue 1996). Une fois la cellule passée en phase S du cycle, les membres de la famille E2F vont être inactivés par phosphorylation de DP. Ceci a pour conséquence une incapacité des complexes E2F/DP à se lier à l'ADN, empêchant ainsi la transactivation des gènes. L'activité de E2F est donc très finement régulée au cours du cycle cellulaire. Au cours des deux premiers tiers de la phase G1, l'activité des facteurs E2F est inhibée via leur liaison à pRb. Ils vont ensuite être activés au moment du passage du point de restriction R. C'est à ce moment que va s'opérer la phosphorylation de pRb qui va permettre la rupture du complexe pRb/E2F et ainsi entraîner la libération des facteurs E2F (*figure 8*). Une fois libérés, ces derniers vont pouvoir transactiver les gènes nécessaires à la poursuite du cycle. Ces derniers sont notamment primordiaux pour la transition G1-S du cycle. Le facteur E2F-1 va en particulier être capable de faire passer des fibroblastes quiescents en phase S. Il est également important de noter qu'E2F-1 est capable d'autoréguler sa production. En effet, son promoteur possède plusieurs sites de fixation spécifiques des facteurs E2F permettant une régulation en fonction de la phase du cycle et notamment une forte augmentation du taux de protéines E2F en fin de phase G1 (Duronio, Brook et al. 1996). Une fois la phase S engagée,

les facteurs de la famille E2F vont être inactivés. Les complexes cycline A/Cdk2 vont entraîner la phosphorylation de DP-1, empêchant ainsi la fixation des facteurs E2F sur l'ADN.

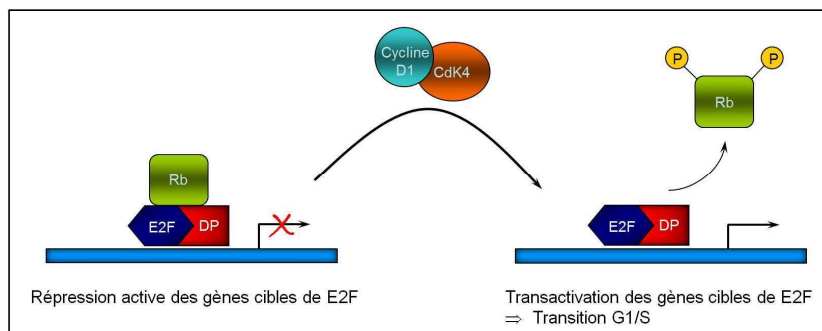


Figure 8 : Régulation de l'activité de E2F via la phosphorylation de pRb

L'inhibition du complexe E2F/DP par pRb empêche les cellules de passer en phase S. La phosphorylation de la protéine Rb par les complexes Cdk/cyclines lève cette inhibition et permet l'expression de gènes nécessaires au passage en phase S.

En plus de son rôle dans la régulation du cycle cellulaire, pRb va également être impliqué dans les phénomènes de différenciation des cellules musculaires en coopération avec le facteur MyoD via une augmentation de l'activité transcriptionnelle de MEF2 (Gu, Schneider et al. 1993; Novitch, Mulligan et al. 1996; Novitch, Spicer et al. 1999). En effet, pRb fut décrit comme un médiateur de l'arrêt du cycle cellulaire induit par MyoD. L'accumulation de la forme déphosphorylée de pRb, caractéristique de l'arrêt de croissance des cellules, est l'un des événements précoces conduisant à la différenciation des cellules musculaires. Il existe donc une corrélation directe entre l'état de phosphorylation de pRb et la capacité des cellules musculaires à sortir du cycle cellulaire.

II.2. Les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CKI)

La régulation des complexes Cdk/cyclines se fait par l'intermédiaire de petites protéines capables de se lier à ces complexes et d'inactiver leur activité kinase. La cellule peut ainsi bloquer sa poursuite dans le cycle cellulaire en réponse à certains stimuli et réduire les possibilités de passer le point de restriction. Les CKI vont ainsi jouer un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire en retardant la mise en place de complexes Cdk/cycline et en

permettant leur mise en œuvre au temps adéquat et de façon ordonnée. Ce type de régulation aura par exemple lieu lors d'une lésion de l'ADN. Les CKI vont alors intervenir afin de bloquer le cycle cellulaire permettant à la cellule d'effectuer les réparations nécessaires.

Ces inhibiteurs sont regroupés selon deux grandes familles. La famille des CIP/KIP (CdK/Kinase Inhibiting Proteins), constituée des protéines p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1/ICK/PIC2} et p57^{KIP2}. Ces trois protéines ont la particularité de pouvoir inhiber la plupart des complexes CdK/cycline à l'inverse des membres de l'autre famille d'inhibiteurs qui inhibent de façon spécifique CdK4/6. Cette deuxième famille est appelée la famille INK4 (Inhibitor of CdK4) et est composée de p15^{INK4b/MTS2}, p16^{INK4a/MTS1/CDKN2/CDK4I}, p18^{INK4c/INK6a}, et p19^{INK4d/INK6b}.

a. Les inhibiteurs CIP/KIP

Les protéines de cette famille sont caractérisées par leur localisation nucléaire ainsi que leur capacité à réprimer tous types de protéines CdK. Cette capacité est due à un domaine situé en N-terminal des trois protéines qui, en se fixant sur une CdK, va entraîner un changement de conformation du site catalytique de cette dernière, bloquant de ce fait son accès à l'ATP.

p21^{CIP1/WAF1} :

Le rôle de p21 est primordial en cas de lésion à l'ADN. Cette protéine permet de bloquer la cellule en phase G1 le temps que les réparations soient effectuées. Elle se lie aux complexes CdK/cycline présents lors de la phase G1 via son domaine N-terminal, ainsi qu'à l'antigène nucléaire PCNA, inhibant l'activation de l'ADN polymérase δ (Cayrol, Cabrol et al. 1997). p21 est donc en mesure de se lier aux complexes CdK4/cycline D et CdK2/cycline E. Il apparaît également que les complexes étant liés à une seule molécule p21 restent actifs alors que les complexes étant liés à plusieurs p21 se trouvent inactivés. Les modifications de la stœchiométrie de p21 semblent donc suffisantes pour expliquer un changement d'activité des complexes CdK/cycline et donc le blocage du cycle cellulaire en phase G1 en cas de lésion de l'ADN. Certaines études tendent également à démontrer que p21 possède également une activité anti-apoptotique (Stewart, Leach et al. 1999; Chakravarthy, Spangenburg et al. 2001). Son rôle dans la différenciation des cellules musculaires et d'autres tissus fut démontré dans plusieurs études. Il fut notamment constaté une forte expression de p21 dans différents

tissus en fin de différenciation *in vivo* (Parker, Eichele et al. 1995) et *in vitro* (Guo, Wang et al. 1995; Halevy, Novitch et al. 1995; Parker, Eichele et al. 1995). En 1999, Zhang confirme à son tour l'implication de p21 dans les phénomènes de différenciation musculaire chez la souris (Zhang, Wong et al. 1999).

p27^{KIP1} :

Cette protéine se lie aux complexes CdK2/cycline E et entraîne la phosphorylation de CdK2 au niveau de la Thr160, conduisant à l'inactivation du complexe. Lors de l'entrée des cellules en cycle, p27 est captée par les complexes CdK/cycline D. La séquestration des molécules de p27 libres entraîne un allègement des contraintes sur les complexes CdK2/cycline E, facilitant ainsi leur activation. En dessous d'un certain seuil de p27 libre, et donc actif, le complexe CdK2/cycline E favorise sa propre activation en phosphorylant p27 (entre autres) et déclenche sa dégradation (Sheaff, Groudine et al. 1997; Vlach, Hennecke et al. 1997). Les molécules de p27 résiduelles étant captées par les complexes CdK4/cycline D, les complexes CdK2/cycline E vont voir leur activité augmenter conduisant ainsi à établir un certain ordre dans l'activation des complexes. Comme dans le cas de p21, la stœchiométrie de p27 détermine son influence sur les complexes CdK /cycline. En effet, la présence d'un nombre restreint de molécules p27 permet la formation des complexes CdK/cycline ainsi que leur activation et leur stabilisation (Cheng, Olivier et al. 1999). Dans un second temps, lorsque la quantité de p27 augmente, c'est l'effet inhibiteur qui prévaut. Enfin, il est également à noter que p27 est en mesure de jouer un rôle dans la myogénèse des myoblastes. En effet, p27 tend à stimuler la production de N-cadhérine, augmentant de fait les contacts cellule/cellule, contribuant ainsi à faciliter la fusion des cellules musculaires (Messina, Blasi et al. 2005).

p57^{KIP2} :

Tout comme p21 et p27, p57 lie les complexes CdK/cycline. La stœchiométrie de la molécule détermine également son action sur les complexes CdK/cycline. À faible concentration, p57 permet la formation de ces complexes ainsi que leur activation. À l'inverse, la présence d'une quantité plus importante de molécules conduit à l'inactivation des complexes (Hashimoto, Kohri et al. 1998). L'induction de p57 conduit au blocage du cycle cellulaire en phase G1 (Lee, Reynisdottir et al. 1995; Matsuoka, Edwards et al. 1995). p57 est en effet capable de se lier aux différents complexes CdK2/cycline E, CdK2/cycline A,

CdK3/cycline E, CdK4/cycline D1-2 et de façon plus occasionnelle aux complexes CdK1/cycline B et CdK6/cycline D2 (Lee, Reynisdottir et al. 1995; Matsuoka, Edwards et al. 1995; Reynaud, Guillier et al. 2000). En parallèle de son influence sur les complexes CdK/cycline, p57 agit sur les processus de myogénèse. p57 est en effet exprimé au tout début du processus de différenciation, lors de la sortie de cycle des noyaux de myoblastes (Kitzmann and Fernandez 2001; Bigot, Jacquemin et al. 2008). Différentes études ont démontré des interactions plus ou moins directes entre p57 et MyoD, menant à un contrôle réciproque entre ces deux protagonistes. p57 est en effet capable de stabiliser MyoD (Reynaud, Leibovitch et al. 2000) qui, de son côté, est en mesure d'induire p57 via l'action de p73 (Vaccarello, Figliola et al. 2006). En 1999, p57 fut également décrit par Zhang & al. comme intervenant dans les processus de différenciation musculaire. L'absence de p57 et de p21 au sein des cellules myogéniques, conduit à une perturbation de l'arrêt prolifératif des cellules avant différenciation. De plus, le squelette ainsi que d'autres tissus, vont également être touchés chez des souris présentant une déplétion de ces deux gènes (Zhang, Wong et al. 1999).

b. Les inhibiteurs INK4

Cette famille de protéines est composée de quatre membres : p16^{INK4A} (Serrano, Hannon et al. 1993), p15^{INK4B} (Hannon and Beach 1994), p18^{INK4C} (Guan, Jenkins et al. 1994; Hirai, Roussel et al. 1995) et p19^{INK4D} (Chan, Zhang et al. 1995; Hirai, Roussel et al. 1995). Ces quatre protéines ont pour caractéristique commune de toutes présenter une structure contenant des répétitions ankyrine (*figure 9*). Ce sont des polypeptides de 15 à 19 kDa partageant environ 40% d'homologie. Les membres de cette famille sont capables d'inhiber les complexes CdK/cyclines et plus particulièrement l'activité kinase de la cycline D (*figure 10*). Pour ce faire, les protéines INK4 vont se mettre en compétition avec les cyclines D afin de fixer les sous-unités CdK (4 et 6). Mais ce type d'inhibition par séquestration de CdK n'est efficace qu'en présence de la protéine Rb au sein de la cellule. En effet, en cas d'absence de pRb, l'expression de cycline E va se voir augmenter, rendant inefficace l'inhibition des complexes CdK4/cycline D et empêchant ainsi le blocage de l'entrée en phase S. Les gènes INK4 possèdent des profils d'expression très différents selon les tissus, ce qui laisse à penser que cette famille d'inhibiteurs du cycle cellulaire possède des fonctions spécifiques à un type

de tissu ou de cellules (Canepa, Scassa et al. 2007 pour une revue). Il est également intéressant de constater qu'une perte de fonction ou une inhibition de certaines protéines INK4 est fréquemment retrouvée dans différents types de cancer, d'où leur étiquette de « suppresseur de tumeur ». Leurs rôles sont assez variés et elles sont exprimées de façon spécifique en fonction de différents paramètres tels que le type ou l'âge des cellules ou du tissu.

p15^{INK4B} :

Le gène de p15 se situe sur le chromosome 9p21 à environ 25kbp en amont du locus de p16. La protéine issue de ce gène contient quatre motifs ankyrine. De plus, elle possède de 50 à environ 70% d'homologies avec p16 selon que l'on considère la partie N ou C-terminale. Cette conservation au niveau de la séquence confère à p15 des caractéristiques proches de celles de p16^{INK4A}. En effet, la déplétion de p15 pourrait jouer un rôle dans la formation de tumeurs du fait de l'absence d'inhibition des CdK (4 et 6). Il est également intéressant de noter que l'expression de p15 va fortement augmenter en présence de TGF- β entraînant une augmentation de sa liaison à CdK4 et 6 et conduisant à un arrêt de la cellule en phase G1 (Reynisdottir, Polyak et al. 1995; Reynisdottir and Massague 1997).

p18^{INK4C} :

Le locus de p18^{INK4C} se trouve sur le chromosome 1 en position p32. La protéine qui en découle possède 38% d'homologie avec p16. À l'inverse de p16, elle possède une affinité plus importante pour CdK6 que pour CdK4. D'un point de vue fonctionnel, tout comme p16, p18 va entraîner un arrêt du cycle cellulaire par inhibition des complexes CdK/cyclines. Cette protéine est notamment exprimée de façon focale durant le développement fœtal, jouant un rôle dans la différenciation terminale de différents types cellulaires (Morse, Chen et al. 1997; Zindy, Quelle et al. 1997).

p19^{INK4D} :

Le gène de p19 est localisé sur le chromosome 9 en position p13. Tout comme p15^{INK4B}, la protéine issue de ce gène comporte quatre motifs ankyrine et présente 48% d'homologie avec la séquence de p16. Les cibles de cette protéine sont les CdK 4 et 6. Elle a été, de ce fait, décrite comme capable d'inhiber les complexes CdK4/cycline D.

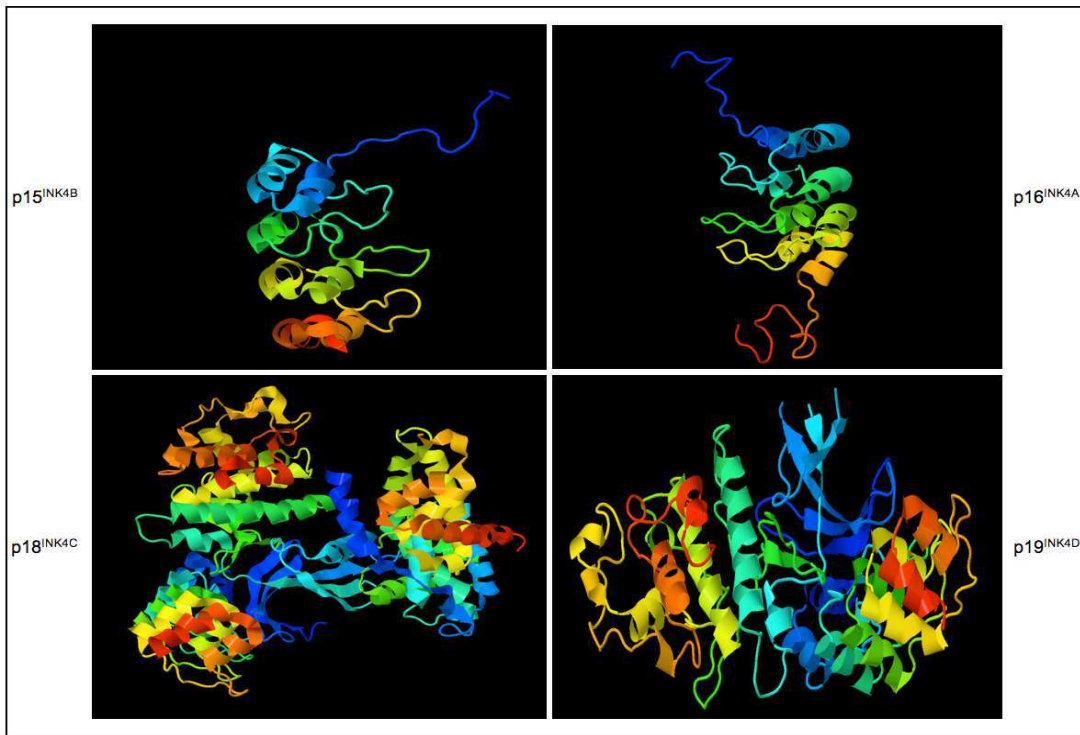


Figure 9 : Structures tertiaires des inhibiteurs INK4 (logiciel Protein Data Bank).

La structure en « hélice-boucle-hélice » est caractéristique des INK4 (motifs ankyrine répétés). p18 et p19 sont représentés en interaction avec Cdk6. (Protein Data Bank)

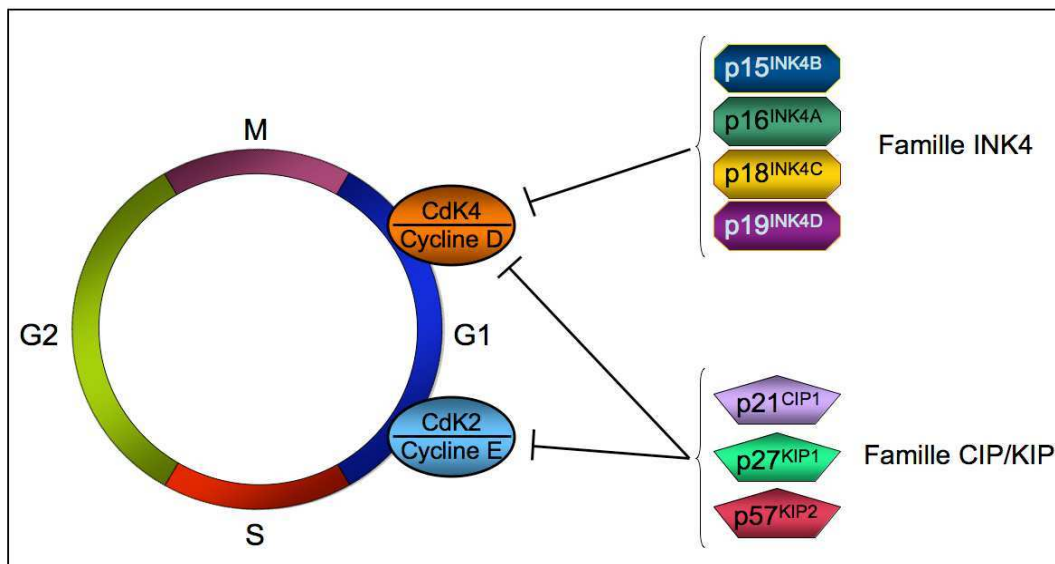


Figure 10 : Les inhibiteurs du cycle cellulaire.

Les CKI (Inhibiteurs des Cyclines dépendantes des Kinases) sont capables d'inhiber les complexes Cdk/cyclines en se fixant sur les Cdk (2, 4 ou 6) afin d'empêcher leur liaison avec les cyclines. Il existe deux familles d'inhibiteurs : la famille INK4 inhibant les complexes Cdk/cycline D et la famille CIP/KIP, capable d'inhiber l'ensemble des complexes Cdk/cycline présents en G1 et S. (d'après L. Meijer, 2003)

Tout comme p18, p19 a été décrit comme pouvant jouer un rôle dans des phénomènes de différenciation terminale de différents types cellulaires (formation des macrophages, myogénèse) (Franklin and Xiong 1996; Adachi, Roussel et al. 1997), et au cours du développement. Son expression va donc varier en fonction du type ainsi que de l'âge du tissu (Morse, Chen et al. 1997; Zindy, Quelle et al. 1997).

p16^{INK4A}:

Le locus d'INK4A est situé sur le chromosome 9 en position p21. La protéine p16 est constituée de 156 acides aminés et contient également quatre répétitions motifs du motif ankyrine. p16 est donc capable d'inhiber les complexes CdK/cycline en se liant à son ligand naturel, CdK4. En outre, différentes études semblent démontrer que le gène p16 est le plus fréquemment muté dans les cas de cancer. Le cas de p16^{INK4A} sera décrit de façon plus approfondie dans une section ultérieure.

Partie III

La sénescence répllicative

III. La sénescence réplivative

III.1. Généralités

La sénescence correspond à un arrêt irréversible du cycle cellulaire, associé à des modifications morphologiques et fonctionnelles de la cellule. Elle peut être causée par différents facteurs comme une taille réduite des télomères ou l'exposition aiguë ou chronique à des signaux de stress physiologiques (UV, oxydant...). Plusieurs voies de signalisation sont susceptibles d'intervenir dans cet arrêt du cycle cellulaire en fonction du signal inducteur. Les cellules somatiques, contrairement aux cellules souches ou aux cellules tumorales, possèdent une capacité proliférative limitée. Cette limite du nombre de divisions a été mise en évidence par Hayflick dès 1961 (Hayflick and Moorhead 1961) à l'aide de fibroblastes humains en culture *in vitro*. Au cours de cette étude, il a décrit les phases de latence et de croissance exponentielle par lesquelles les cellules passent au cours de leur vie proliférative en culture avant de voir leur croissance ralentir pour atteindre la limite dite « de Hayflick » correspondant à un état de sénescence réplivative. On considère que les cellules sont en sénescence lorsque celles-ci n'ont pas fait de division pendant trois semaines dans un milieu prolifératif. Pour autant, le métabolisme des cellules atteignant cet état n'est pas stoppé. Les cellules en sénescence peuvent être conservées en culture pendant plusieurs mois. Les cellules sénescents présentent trois caractéristiques principales qui les différencient des autres cellules : un arrêt prolifératif irréversible, une résistance aux mécanismes d'apoptose et l'apparition de modifications morphologiques et métaboliques. Enfin, deux voies sont impliquées dans l'induction de la sénescence des myoblastes humains: la voie p53 (télomères dépendante) et la voie p16 (stress dépendante).

a. L'arrêt prolifératif

En entrant en sénescence, les cellules sortent du cycle cellulaire de manière irréversible. On considère qu'elles sont dans une phase dite G0 située après la phase G1. Les cellules ayant atteint ce point de non-retour, sont incapables de ré-initier une quelconque synthèse d'ADN, et ce, malgré une stimulation par des mitogènes. Le passage en sénescence

est également synonyme d'altération de l'activité ou de la transcription de différents gènes, notamment ceux impliqués dans le passage G1-S. De façon générale, les cellules en sénescence présentent des taux moins élevés de protéines et d'ARN que ceux retrouvés dans des cellules en phase exponentielle de croissance. La régulation négative observée pour les facteurs de transition G1-S est principalement due au maintien sous forme hypo-phosphorylée de la protéine Rb (Lukas, Parry et al. 1995; Suzuki-Takahashi, Kitagawa et al. 1995; Bigot, Jacquemin et al. 2008). Ceci va entraîner une séquestration du facteur de transcription E2F nécessaire à l'activation transcriptionnelle des gènes permettant le passage G1-S. De plus, les cellules sénescents présentent une surexpression de CKI capables d'inhiber les complexes CdK/cycline, empêchant ainsi la poursuite du cycle en bloquant la transition entre les phases G1 et S. Différentes protéines peuvent présenter un pic de surexpression aux abords de l'entrée en sénescence. C'est notamment le cas de p21 (Smith 1992; Noda, Ning et al. 1994; Tahara, Sato et al. 1995; Wong and Riabowol 1996), de p16 (Alcorta, Xiong et al. 1996) mais également de p53 (Kulju and Lehman 1995; Vaziri and Benchimol 1996; Vaziri, West et al. 1997).

b. La résistance au processus d'apoptose

L'une des caractéristiques des cellules sénescents est leur capacité à résister au phénomène de mort programmée, également appelé apoptose. Les mécanismes permettant de comprendre le lien entre la sénescence des cellules et leur résistance à l'apoptose sont encore mal connus. Une étude récente a émis l'hypothèse qu'un défaut de signalisation vers le noyau dans les cellules sénescents pourrait expliquer leur résistance (Roue, Pichereau et al. 2008). En effet, ces auteurs ont constaté une forte diminution de la transduction des signaux p38 et Erk 1/2 au sein des cellules sénescents lorsque ces dernières sont soumises à un stress de type H₂O₂ ou staurosporine (inhibiteur de la PKC et inducteur d'apoptose respectivement). Cette résistance des cellules à l'apoptose pourrait expliquer l'accumulation de cellules sénescents *in vivo* (Dimri, Lee et al. 1995).

c. Les modifications morphologiques

Le vieillissement *in vitro* des cellules humaines est caractérisé par des modifications morphologiques importantes. En sénescence, la taille des cellules ainsi que celle de leur noyau, va fortement augmenter. Les cellules vont également adopter une forme caractéristique des cellules sénescents *in vitro*, à savoir étalée et irrégulière (figure 11). Différentes études ont permis de déterminer les spécificités morphologiques retrouvées au sein des cellules sénescents : un rapport nucléo-cytoplasmique diminué (Sherwood, Rush et al. 1988), une augmentation de la taille et du nombre de lysosomes (Robbins, Levine et al. 1970; Brunk 1973), un allongement des mitochondries ainsi qu'une déstructuration de leur enveloppe (Robbins, Levine et al. 1970; Goldstein and Korczaek 1981). Enfin, on constate une désorganisation massive de leur cytosquelette conduisant à une certaine rigidité, probablement responsable de leur diminution de mobilité (Wang 1985).

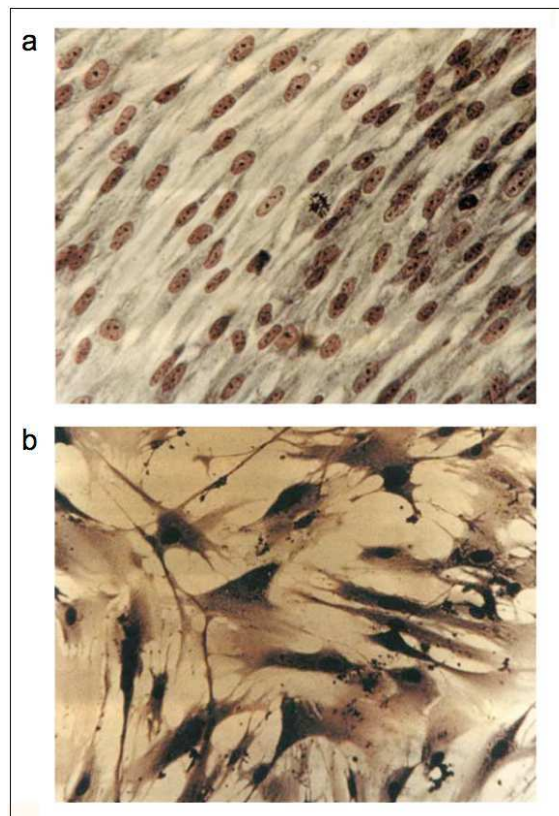


Figure 11 : Clichés de fibroblastes jeunes et sénescents

(a) Les cellules sont en phase de prolifération et possèdent une morphologie caractéristique : taille réduite, contours réguliers, noyaux démarqués. (b) A l'inverse, les cellules sénescents sont caractérisés par un étalement de leur cytoplasme, des contours cellulaires très irréguliers. (d'après Shay and Wright 2000)

d. Les modifications métaboliques

La sénescence ne correspond pas à un arrêt complet des fonctions métaboliques de la cellule. Au contraire, celle-ci reste viable durant de longues périodes. De plus, elle présente une activité de synthèse et de dégradation des macromolécules (ARN et protéines), malgré une diminution de ces taux par rapport à ceux trouvés dans des cellules réplivatives (Campisi 2000). Il a également été constaté, dans certains types cellulaires, une augmentation de l'activité de certaines protéases impliquées dans la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire (collagénase, stromelysine), mais également une réduction de l'expression des inhibiteurs de ces mêmes protéases. La sénescence des cellules s'accompagne d'une diminution d'expression de différentes protéines et enzymes impliquées dans la synthèse, la structure et la réparation de l'ADN. De nombreux gènes voient également leur expression perturbée, parmi lesquels nombre de facteurs de croissance, de cytokines ou encore de régulateurs du cycle cellulaire (Cristofalo, Phillips et al. 1989; Cristofalo and Tresini 1998; Cristofalo, Volker et al. 1998). Enfin, l'activité anormale de la β -galactosidase est généralement considérée comme un marqueur de sénescence. En effet, dans de nombreux types cellulaires, la β -galactosidase (hydrolase lysosomale) voit son activité augmentée pour des pH inhabituels. Active pour un pH de 4 dans des cellules en prolifération, la β -galactosidase devient détectable à un pH de 6 dans des cellules sénescents (Dimri, Lee et al. 1995). La modification de l'activité de cette enzyme a été reliée à une augmentation de la densité lysosomale, elle-même due à un accroissement du nombre de processus d'autophagie (Gerland, Peyrol et al. 2003).

III.2. La voie « télomères dépendante »

En 1973, le concept de régulation de l'horloge mitotique par la réduction progressive de l'ADN télomérique fut proposé par Olovnikov (Olovnikov 1973). Partant des observations réalisées par Hayflick selon lesquelles l'âge du donneur détermine la capacité proliférative des cellules et que celles-ci, même soumises à une congélation, conservent une « mémoire » du nombre de divisions qu'elles ont effectué, Olovnikov a émis, à partir du mécanisme de

réplication de l'ADN, l'hypothèse que la sénescence cellulaire découlait d'une perte excessive de l'ADN télomérique. En effet, à chaque division, l'ADN polymérase qui permet de répliquer l'ADN, se voit dans l'incapacité de dupliquer, de façon intégrale, les séquences télomériques 3' terminales présentes aux extrémités des doubles brins d'ADN. Ainsi, la taille des télomères se voit réduite à chaque division d'environ 50 à 150 paires de bases (pdb). À partir d'une taille critique d'environ 6kb, un télomère est considéré par la cellule comme une source d'instabilité qui va être à l'origine d'un signal conduisant à la sénescence de la cellule (Wright and Shay 2001). Les télomères ayant atteint leur taille critique, sont reconnus comme des cassures de l'ADN et vont activer les systèmes de réparation de l'ADN. La mise en œuvre de ce mécanisme conduit à une augmentation de l'activité de p53 (Vaziri and Benchimol 1996) ayant pour conséquence une accumulation de la protéine p21^{WAF1} qui inhibe les complexes CdK/cyclines et provoque un arrêt du cycle cellulaire.

Ainsi, p53 joue un rôle central dans le devenir des cellules. Son activation conduit la cellule vers l'une des deux voies terminales, la sénescence ou l'apoptose. p53 est un des principaux suppresseurs de tumeurs et son inhibition contribue à l'immortalisation de certains types cellulaires ainsi qu'un accroissant de l'instabilité chromosomique. Les télomères, formés par des répétitions de séquences TTAGG et de protéines spécifiques, assurent la stabilité des extrémités chromosomiques. La prolongation de la capacité proliférative au-delà de la limite de Hayflick, va entraîner une érosion excessive des télomères. Les extrémités chromosomiques n'étant plus protégées du fait de la taille réduite des télomères (Karlseder, Smogorzewska et al. 2002), en résulte une forte instabilité génomique qui participe au processus de tumorigenèse ou de déclenchement de la mort cellulaire (Collins 2000). Dans certains types cellulaires comme les cellules germinales, certaines cellules souches ainsi que des cellules tumorales ou immortalisées, l'érosion des motifs télomériques (répétitions TTAGG) est compensée par la présence d'une transcriptase inverse spécifique, la télomérase (Cong, Wright et al. 2002). Celle-ci va assurer la synthèse de novo des répétitions télomériques sur les télomères préexistants, maintenant ainsi leur longueur au cours des divisions.

III.3. La voie p16^{INK4A}

a. Locus INK4A/ARF (CDKN2A)

La protéine p16^{INK4A} est issue du locus INK4A/ARF, présent en position 9q21. Ce locus est tout à fait particulier car il contient deux gènes codant pour deux protéines dont la fonction est différente, bien que ceux-ci aient deux exons en commun. Le premier variant issu de ce locus est généré à partir des exons 1 α , 2 et 3, et correspond à p16^{INK4A}. Le second variant, p14^{ARF} est formé des exons 1 β , 2 et 3. En outre, le cadre de lecture de p14^{ARF} (pour Alternative open Reading Frame) est différent de celui de p16 conduisant à une absence d'homologie entre les deux protéines. Il faut également noter que ce locus se trouve fréquemment inhibé dans de nombreux types de cancers chez l'Homme, d'où sa dénomination de MTS1 pour Major Tumor-Suppressor Locus. L'épissage alternatif de ce locus permet d'obtenir deux protéines possédant un promoteur ainsi qu'un exon 1 propres à chacune (Figure 12) (Bodenez, Darrouzet et al. 2006).

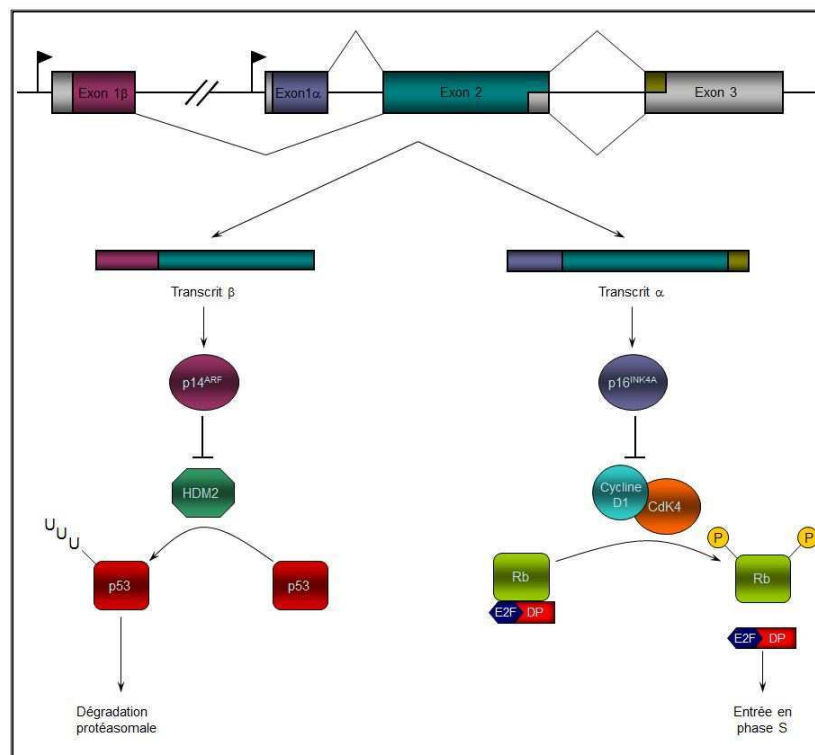


Figure 12 : Schéma du locus du gène CDKN2A (9q21), de ces produits et de leur implication dans la régulation du cycle cellulaire.

Les protéines issues des transcrits alternatifs du locus CDKN2A vont agir tous deux sur l'arrêt du cycle cellulaire mais en touchant deux voies bien distinctes. Le locus CDKN2A est en mesure de produire deux autres variants (p12 et p16 γ) mais leur production reste très minoritaire (p16 γ) ou localisée dans certains organes (p12 dans le pancréas).

Les deux molécules décrites précédemment vont intervenir dans deux voies séparées. De par son action sur la protéine de dégradation HDM2 (MDM2), p14^{ARF} participe aux phénomènes de sénescence réplivative et/ou d'apoptose via la stabilisation de p53 et l'induction de p21^{CIP1}. De son côté, p16^{INK4A} intervient directement au niveau de certains acteurs du cycle cellulaire. En effet, p16 est capable d'inhiber les CdK4 et 6 et ainsi bloquer les complexes CdK/cycline formés à partir de ces dernières. Une fois le complexe CdK/cycline inhibé, le complexe protéique Rb/E2F ne peut plus être phosphorylé. Ceci va avoir pour conséquence l'impossibilité pour la cellule d'entrer en phase S, et donc un blocage du cycle cellulaire en phase G1.

La complexité de la régulation de p16 est due à la nature même du locus INK4. En effet, les trois gènes présents sur ce locus (p14^{ARF}, p15^{INK4B} et p16^{INK4A}) possèdent chacun un promoteur indépendant permettant une régulation indépendante de chacun d'entre eux. Cependant, leur regroupement sous un même locus permet également une régulation globale et/ou coordonnée grâce à des événements de remodelage chromatinien (Barreau, Paillard et al. 2005; Barreau, Paillard et al. 2006) (*figure 13*). Plusieurs études ont permis de déterminer des sites de fixation de facteurs de transcription présents sur le promoteur de p16^{INK4A}. Ainsi les sites Ets, boîte E, sites de Sp1, site de RHA et site de ITSE ont été identifiés, indiquant que la transcription de p16 est sujette à de multiples niveaux de contrôle.

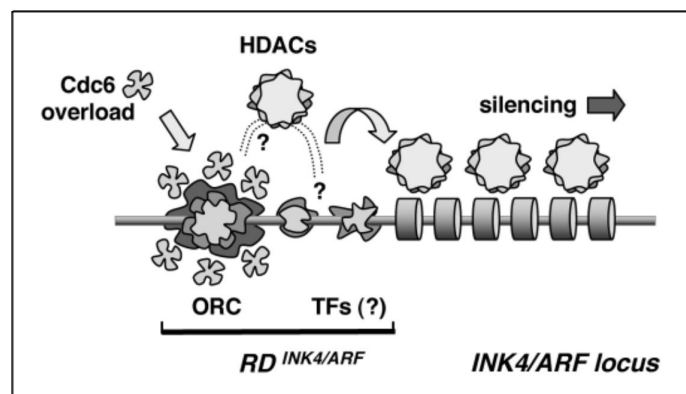


Figure 13 : Modèle mécanistique de l'inhibition du locus INK4/ARF par Cdc6

La présence d'une forte concentration de Cdc6 peut conduire à un recrutement des histones déacétylases (HDAC) 1 & 2. La désacétylation de la chromatine va conduire à une condensation de cette dernière sous forme d'hétérochromatine, et à une inhibition du locus INK4/ARF. (d'après Gonzalez and Serrano 2006)

b. Mécanismes d'activation de la voie p16

La voie p16^{INK4A} est une voie complexe, capable de bloquer la progression du cycle cellulaire et de faire passer la cellule dans une phase d'arrêt prolifératif similaire à la sénescence. Au contraire, son inhibition est associée à de nombreux événements de dérégulation du cycle cellulaire. En effet, les mutations ou délétions de cet inhibiteur de cyclines dépendante des kinases, sont associées à de multiples types de cancers (Sharpless and DePinho 1999), en particulier les mélanomes. Néanmoins, les raisons reliant la perturbation génétique de p16 et la prédisposition à ce type de cancer restent mal définies. De plus, la voie p16 est également une voie de réponse au stress cellulaire (Wang, Chen et al.). La régulation de l'expression de la protéine p16 peut se faire à deux niveaux : transcriptionnel et post-traductionnel.

Régulations transcriptionnelles :

Divers éléments régulateurs sont retrouvés au niveau du promoteur de p16. Un site Ets-binding, positionné entre -124 et -85, a été identifié. Il permet la liaison des facteurs de transcription Ets ½ (Lim, Park et al. 2011), connus comme des cibles de la voie de signalisation Ras-Raf-MEK et pouvant être activés par phosphorylation via une activité MAPK. Leur fixation sur le promoteur de p16 entraîne une hypo-méthylation de ce dernier, aboutissant à une régulation positive de p16 et donc un arrêt prolifératif. On peut également noter que les protéines de la famille Id, notamment Id-1 qui possède une structure type hélice-boucle-hélice, vont pouvoir inhiber l'activité de Ets ½, empêchant de ce fait la transcription de p16.

Le promoteur de p16 peut aussi être régulé par la voie RAS/Raf/MEK/MAPK (Erk) (Malumbres, Perez De Castro et al. 2000). Les protéines faisant parties de la famille des MAPK (Erk, JUNK, p38) interviennent dans des phénomènes de réponse au stress et d'inhibition de la croissance cellulaire. Erk ½ a notamment été impliqué dans l'activation de p16 conduisant à une inhibition de la croissance cellulaire (Wen-Sheng 2003). Ainsi l'activation de Erk ½, en présence d'un niveau élevé de ROS intracellulaire, conduit à un passage des cellules en sénescence (Kim and Wong 2009). Erk ½ n'active pas de façon directe p16^{INK4A} mais agit par l'intermédiaire de Bmi-1, protéine du groupe polycombs, régulant de façon négative la transcription de p16. Erk ½ vient réprimer l'activité de Bmi-1 en

empêchant ce dernier de se fixer à la chromatine, permettant ainsi la dé-répression de p16 (Korochkina, Barreau et al. 2006).

Il a également été démontré la présence d'une région activatrice riche en GC sur le promoteur p16 contenant de potentielles CG-box capables de fixer des facteurs de transcription de type Sp (1-2-3). Enfin, le facteur JunB a également été décrit pour réguler de façon positive la production d'ARNm p16 (Passegue and Wagner 2000). En effet, en se fixant sur des éléments régulateurs du promoteur, JunB va entraîner l'expression de la protéine p16 conduisant à un blocage du cycle cellulaire.

Régulations post-transcriptionnelles :

La région 3'-UTR de l'ARNm de p16, constituée d'une structure en tige-boucle, peut être la cible de la protéine régulatrice RBP (RNA Binding Protein), aussi appelée AUF1. Cette dernière, en se fixant sur cet ARN entraîne sa déstabilisation conduisant, *in fine*, à une diminution du niveau d'expression de la protéine p16. AUF1 a été présenté comme pouvant être impliqué dans la régulation de la sénescence (Wang, Martindale et al. 2005) avec l'aide de HuR (Hu RNA Binding Protein) (Chang, Yi et al.). Une autre étude a également permis de déterminer l'implication de certains miRNA dans la régulation négative de p16. miR24-2 est apparu comme un candidat intéressant pour ce type de régulation du fait de sa capacité d'interaction avec la région 3'-UTR de l'ARN p16. Cette étude a démontré que la régulation via miR24-2 ne conduisait pas à une dégradation de l'ARN de p16 mais plutôt à une inhibition de sa traduction (blocage de l'initiation et/ou de l'élongation) en protéine. En effet, une forte réduction de la quantité de protéine p16 est observée alors que le niveau d'ARNm est resté inchangé (Lal, Kim et al. 2008).

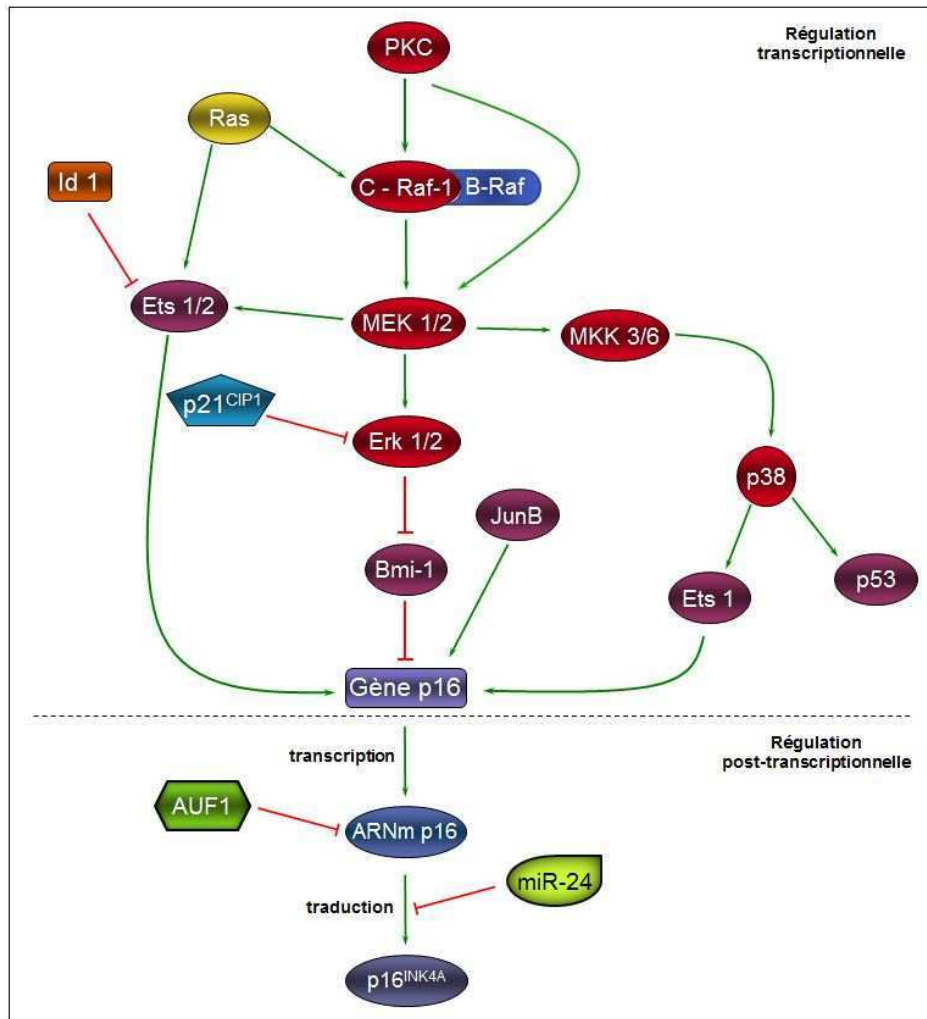


Figure 14 : Schéma des différents mécanismes de régulation de la voie p16^{INK4A}

De nombreux facteurs sont en mesure d'intervenir dans la régulation de la voie d'expression de p16 au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel.

Un grand nombre de facteurs Cis et Trans est donc susceptible de réguler de façon positive ou négative l'expression de p16^{INK4A}, et ce, grâce à divers mécanismes. La régulation de p16 est donc complexe et sous le contrôle de diverses voies métaboliques.

III.4. Induction de la sénescence par un stress

Le mécanisme de sénescence réplivative peut également être activé par un stress. On parle alors de SIPS pour sénescence induite prématurément par le stress (Toussaint, Medrano et al. 2000). Ce stress peut être de type et de nature variés. Il peut être chronique en plaçant les cellules dans un environnement contenant trop d'oxygène (hyperoxie), ou aigu grâce à l'addition d'agents oxydants (peroxyde d'hydrogène, tert-butylhydroperoxide, UV...) au milieu de culture. Ces différents stress aboutissent tous aux mêmes types de modifications morphologiques et métaboliques que celles observées lors de la sénescence réplivative.

a. Modification du taux d'oxygène dans les cultures

En temps normal, la plupart des cellules sont cultivées *in vitro* dans un incubateur saturé en humidité avec un taux d'oxygène de 19%. Cependant, pour des cellules comme les myoblastes, une pression partielle en oxygène plus faible (3-5%) correspond à des conditions physiologiques plus proches de celles observées *in vivo* dans le muscle. La culture des myoblastes dans ce type de conditions, va avoir pour conséquence d'augmenter leur vitesse de croissance ainsi que de favoriser la formation de clones (nombre et taille) lorsque les cellules sont ensemencées à basse densité (Chakravarthy, Spangenburg et al. 2001). De plus, des cellules musculaires ainsi que des fibroblastes cultivés avec des concentrations basses en oxygène (3 à 5%), voient leur capacité proliférative augmentée de façon significative (40 à 50%) dans différentes études (Chakravarthy, Spangenburg et al. 2001; Csete, Walikonis et al. 2001). Inversement, la croissance des cellules peut être progressivement stoppée avec l'augmentation de la pression partielle en oxygène (Balin, Fisher et al. 1984).

b. Addition de substances oxydantes au milieu de culture

Différentes substances peuvent être utilisées afin de soumettre des cellules à des stress oxydants. Deux d'entre elles sont particulièrement connues pour entraîner une SIPS, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le tert-butylhydroperoxide (t-BHP).

Peroxyde d'hydrogène :

Le stress induit par le peroxyde d'hydrogène peut entraîner différents phénotypes en fonction de la concentration utilisée, du temps d'exposition ainsi que du type de cellules traitées. Au cours de leur étude, Bladier & al. ont déterminé que des concentrations de 50 à 100 μ M appliquées pendant 24h sur des cultures de fibroblastes humains, conduisent à un phénomène de SIPS alors que des concentrations de 300 à 400 μ M déclenchent un mécanisme d'apoptose (Bladier, Wolvetang et al. 1997). Des traitements plus courts mais à des concentrations plus élevées ont également été décrits comme pouvant induire une SIPS. Ce type de traitement induit un arrêt provisoire de la synthèse d'ADN ainsi qu'à une réduction de la production de protéines (Mocali, Caldini et al. 1995).

Tert-butylhydroperoxyde :

Le t-BHP est un hydroperoxyde utilisé comme source de radicaux libres. Cette substance est capable de mimer l'effet toxique des acides gras peroxydés en formant des radicaux de type ROO \bullet . Comme le peroxyde d'hydrogène, le t-BHP est capable d'engendrer un arrêt prolifératif des cellules. Ainsi, une série de plusieurs traitements à 30 μ M sur des fibroblastes en culture mène à un arrêt prolifératif qui s'accompagne d'une augmentation de l'activité β -galactosidase dans les cellules, marquant leur passage dans un état d'arrêt prolifératif similaire à la sénescence (Dumont, Royer et al. 2001).

Partie IV

Le stress oxydatif

IV. Le stress oxydatif

IV.1. Généralités sur le stress oxydatif

D'un point de vue cellulaire, le stress oxydatif est engendré par la présence de molécules réactives dérivées de l'oxygène : les radicaux libres. La présence de ces molécules particulièrement nocives pour l'organisme et donc pour les cellules, va conduire à une détérioration des différentes molécules (protéines, lipides, sucres et même ADN). Les cellules humaines étant anaérobies, les radicaux libres vont s'accumuler tout au long de leur vie proliférative, ce phénomène étant probablement plus marqué encore dans des conditions de culture *in vitro* classiques ($pO_2 = 20\%$). Certaines hypothèses vont jusqu'à considérer que les phénomènes de vieillissement cellulaire et de sénescence répliquative, sont imputables à l'accumulation de radicaux libres toxiques au sein des cellules.

Il existe différents dérivés oxydants formés à partir de l' O_2 (Figure 15). Ils ont tous comme caractéristique commune de posséder un nombre d'électrons impair. De façon physiologique, ces dérivés sont formés au niveau de la chaîne respiratoire présente sur la membrane mitochondriale. Cette chaîne de transport d'électron peut laisser fuir une certaine proportion d'électrons qui vont pouvoir venir réduire en partie des molécules d'oxygène. Ainsi, 2 à 4% de l'oxygène va subir une réduction mono-électronique conduisant à la formation du radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$.

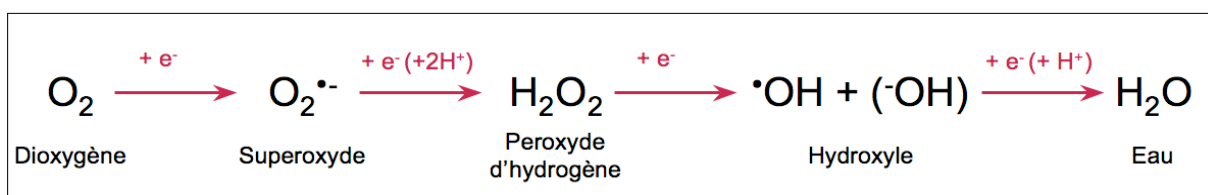


Figure 15 : Radicaux libres dérivés de l'oxygène

Schéma des différentes étapes de formation de l'eau à partir du dioxygène et des intermédiaires réduits de l'oxygène.

Le peroxyde d'hydrogène est un intermédiaire important de cette chaîne. Cette molécule ne fait pas partie de la famille des radicaux libres puisque ne possédant pas d'électrons libres (état réduit). Malgré tout, il s'agit d'un élément toxique du fait de sa

capacité à former le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ en présence de cations métalliques tels que Fe^{2+} ou Cu^+ . L'hydroxyle est un élément particulièrement délétère pour de nombreux types de molécules. Il peut, par exemple, réagir avec les bases de l'ADN en s'additionnant sur les doubles liaisons (Cadet, Delatour et al. 1999), mais également réagir avec les acides gras polyinsaturés des phospholipides et des phosphoprotéines, initiant des chaînes de peroxydations lipidiques. De plus, le radical hydroxyle est capable d'interagir avec les acides aminés et de perturber la fonction enzymatique de certaines enzymes.

Les espèces réactives de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène, radicaux libres superoxydes et hydroxyles) sont produites de façon accrue lors d'une dérégulation du métabolisme de l'oxygène (stress oxydant). Ces espèces sont responsables, d'une manière directe ou indirecte, de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, lipides, protéines...), pouvant affecter considérablement les mécanismes cellulaires. En additionnant certaines substances comme le peroxyde d'hydrogène ou le tert-butylhydroperoxide aux milieux de culture des cellules, il est possible de créer des conditions de stress oxydant permettant d'analyser les phénomènes moléculaires qui y sont associés.

IV.2. Stress oxydatif et voies moléculaires

De nombreuses voies de signalisation sont connues pour leur sensibilité face au stress oxydatif. C'est notamment le cas de la voie des MAP Kinase ainsi que de la voie de transduction régulée par NF- κ B. La plupart des effets redox vont passer par ces voies de façon plus ou moins directe.

Les signaux extracellulaires comme les cytokines, les facteurs de croissance ou les ROS, vont entraîner des changements au niveau des cellules par l'intermédiaire de mécanismes complexes mettant en jeu des transmissions de signaux allant de la membrane plasmique jusqu'au noyau où l'expression des gènes pourra être modifiée (Karin and Hunter 1995; Karin, Liu et al. 1997). Les cellules eucaryotes possèdent pour la plupart, des cascades moléculaires de kinases capables d'activer des MAPKinases (Mitogen Associated Protein Kinase) (*figure16*). Des cellules soumises à des stress environnementaux importants comme ceux induits par les ROS, les UV ou la chaleur, sont alors en mesure d'activer plusieurs de ces voies MAPK.

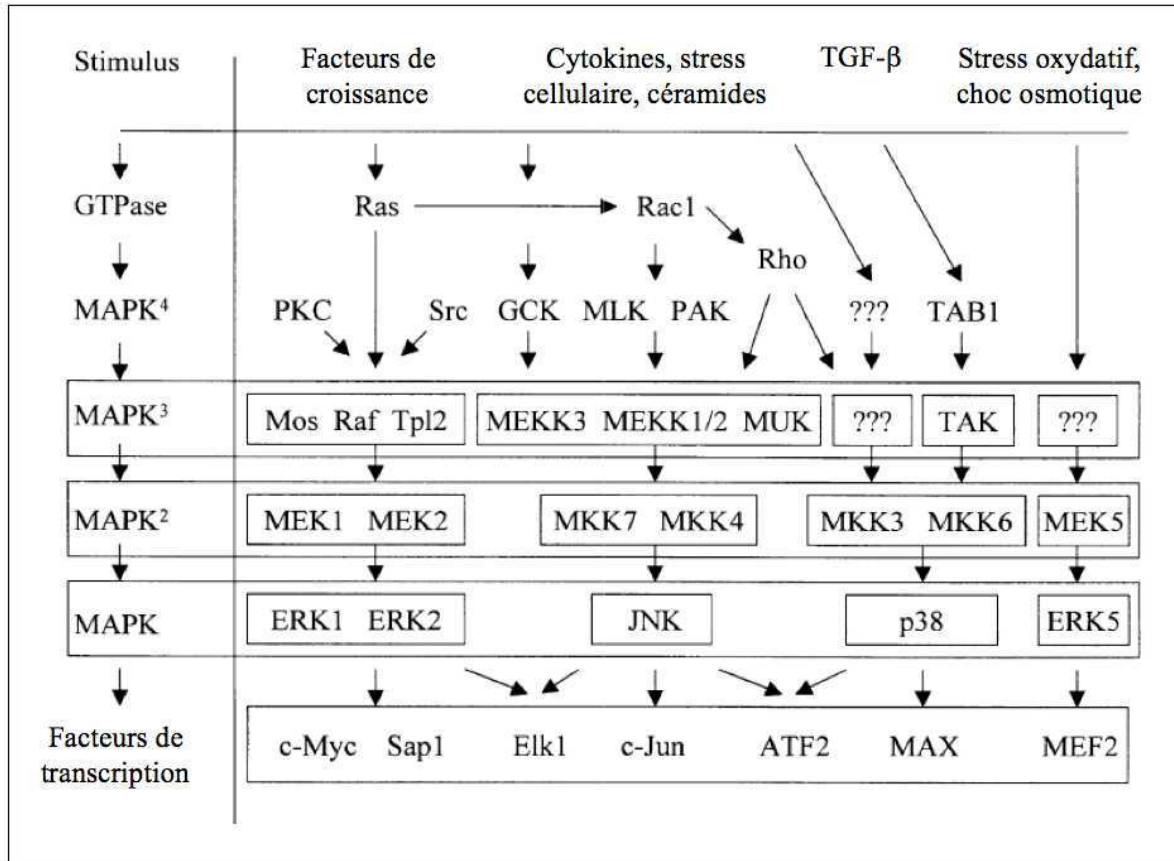


Figure 16 : Schéma récapitulatif des différentes cascades de MAPK

Les cascades de MAPK sont des voies complexes pouvant être activées par différents stimuli et interagir entre elles. Elles peuvent activer un grand nombre de facteurs de transcription (liste non exhaustive). (Pour une revue Yoon, Yun et al. 2002)

Quatre sous-familles de MAPK ont été identifiées comme jouant un rôle fondamental dans le système des cellules eucaryotes : ERK, JNK/SAP, p38 et BMK1 (ERK5). Les voies régulées par ces différents acteurs, sont connues comme possédant des passerelles d'activation via le stress oxydatif. Ces différentes voies étant à la fois impliquées dans différents mécanismes et en relation plus ou moins étroites les unes avec les autres, il est relativement compliqué de définir les fonctions spécifiques de chacune d'entre elles.

- Voie de signalisation ERK :

Le stress oxydatif est bien connu pour être un activateur de la voie ERK dans différents types cellulaires comme les cardiomyocytes, les hépatocytes, les lymphocytes T, les astrocytes, les fibroblastes ainsi que les cellules du muscle lisse, épithéliales ou pleurales. Les acteurs de cette voie, ERK1 (44 kDa) et ERK2 (42 kDa), sont activés par les facteurs MEK 1/2 (MAP/ERK Kinase). MEK1 et 2 sont eux-mêmes activés par les protéines RAF (RAF1,

A-RAF, B-RAF) qui font suite à la protéine RAS dans la cascade de signalisation, l'intervention de cette dernière n'étant pas indispensable. L'activité des protéines ERK peut être régulée de manière indirecte. En effet, la modulation des molécules régulant les protéines MEK, placées en amont de ERK, est capable d'entraîner des modifications d'activité de ERK (Lee, Choi et al. 2005; Lee, Kim et al. 2006). Certains intermédiaires des ROS sont également connus pour leur capacité d'activation du récepteur à l'EGF, conduisant à l'activation des acteurs de la voie RAF/MEK/ERK, et jouant ainsi un rôle sur les mécanismes de prolifération des cellules ainsi que sur leur viabilité (Braun, Buschhausen-Denker et al. 1989; Gamou and Shimizu 1995; Goldkorn, Balaban et al. 1998; Zhuang and Schnellmann 2004). L'activation de ce type de récepteurs n'est pas la seule voie par laquelle la voie de signalisation ERK peut être activée. Les ROS sont également capables d'activer certaines Src kinase (Tapscott, Davis et al. 1988; Lee and Esselman 2002), ces dernières ayant un rôle sur l'activation de RAS et donc potentiellement sur l'activation de la voie ERK. La protéine Src va également être en mesure d'activer la voie ERK en l'absence du facteur RAS (Cho, Thienes et al. 2005). Enfin, le peroxyde d'hydrogène peut aussi conduire à un influx calcique dans différents types cellulaires (Choi and Myer 1990; Howe, LaHair et al. 2002), ayant pour conséquence l'activation de différentes voies moléculaires dont la voie ERK (Atherfold, Norris et al. 1999).

De nombreuses molécules sont donc susceptibles d'être impliquées dans la régulation de la voie ERK lors d'un stress oxydatif, parmi lesquelles certaines possèdent un rôle central dans le métabolisme de la cellule comme RAS, PLC ou PKC. L'ensemble des acteurs influant sur la voie ERK va ainsi contribuer à la régulation de la survie des cellules lors d'un stress oxydant.

- **Voie de signalisation JNK :**

La voie JNK emprunte le même type de cascade de kinase que celle observée dans la voie ERK, celle-ci aboutissant à l'activation de JNK (Jun-N-terminal Kinase). Tout comme la voie ERK, elle fait intervenir plusieurs acteurs comme MKK4/7 (MAPKK4/7), MEKK1/4, Rac ou encore ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1). L'activation de cette voie moléculaire peut se faire via les récepteurs TNF (Tumor Necrosis Factor) et FAS (Karmann, Min et al. 1996; Batra, Charizanis et al. 2010). La voie JNK peut être activée par une grande variété d'agents de stress cellulaire comme une exposition aux UV, à des métaux lourds ou

aux radiations, ainsi que par certaines drogues et les ROS. Il existe plusieurs cibles en aval de la voie JNK : Jun, ATF-2, Elk2, Nrf2, p53...

Dans le cas d'un stress oxydatif, les molécules MEKK1 et ASK1 vont être activées (*figure 17*). La modulation du niveau d'ASK1 va se faire directement en fonction du statut redox de la cellule par l'intermédiaire de la thiorédoxine. Cette dernière est un inhibiteur d'ASK1. Le niveau redox de la cellule peut entraîner une inactivation de la thiorédoxine, notamment en présence de ROS. L'inhibition de la thiorédoxine va ainsi permettre l'activation d'ASK1, conduisant la cellule vers la voie apoptotique (Saitoh, Nishitoh et al. 1998; Yoon, Yun et al. 2002).

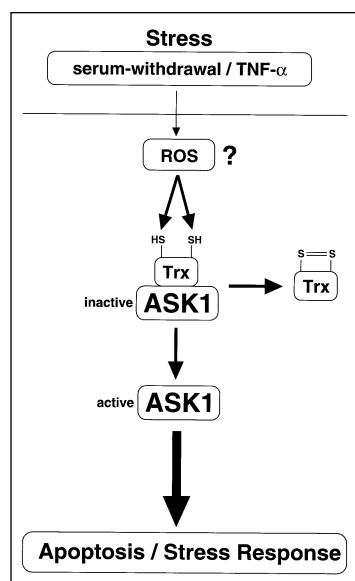


Figure 17 : Modèle de mécanisme d'apoptose induite par le stress et médiée par l'activation d'ASK1 en fonction du stress oxydatif (d'après Saitoh, Nishitoh et al. 1998)

De la même façon, l'activation de la voie de signalisation JNK via les récepteurs TNF peut aussi être modulée par le niveau de ROS (Kyriakis, Banerjee et al. 1994; Liu 2003). En effet, l'inhibition d'espèces réactives comme les anions superoxydes ou les peroxydes lipidiques, va conduire à une activation de la voie JNK (Shrivastava and Aggarwal 1999).

La voie JNK semble particulièrement importante pour les mécanismes touchant à la mort cellulaire. Ainsi, l'inhibition de JNK par des peptides spécifiques, bloque la mort cellulaire en réponse à une ischémie. La délétion d'ASK1 est également capable de protéger les cellules d'une mort cellulaire en réponse à un stress oxydant. Dans certains types cellulaires, JNK a été décrit comme possédant des propriétés anti-apoptotiques. Le peroxyde d'hydrogène est ainsi capable d'induire une mort cellulaire par apoptose des cardiomyocytes,

et leur sensibilité à cet agent a été décrite comme inversement proportionnelle à la présence de MEKK1 dans les cellules. Or, JNK, via un promoteur ARE, est capable d'activer l'expression de MEKK1, augmentant ainsi les capacités de protection des cardiomyocytes (Minamino, Yujiri et al. 1999).

- **Voie de signalisation p38 :**

p38 MAPK peut être phosphorylée et activée à la fois par MKK3 et MKK6. De la même façon que les MAPKKs des voies JNK et ERK, MKK3 et 6 phosphorylent une MAPK, en l'occurrence, p38. Dans la cascade de signalisation, MKK3 et 6 sont directement en aval de la kinase MLK3 elle-même activée par les petites protéines G Rac1 et cdc42 (Teramoto, Coso et al. 1996). Différents facteurs de croissance tout comme les récepteurs de la famille des TNF sont connus pour activer cette voie moléculaire.

Différentes espèces réactives, comme le peroxyde d'azote (Schieke, Briviba et al. 1999), l'oxyde nitrique (Lander 1996; Lander, Jacovina et al. 1996), le peroxyde d'hydrogène (Guyton, Liu et al. 1996) ou encore l'ion superoxyde (Klotz, Pellieux et al. 1999; Zhuang, Demirs et al. 2000; Cheng, Chan et al. 2001), peuvent activer la voie p38. Le mécanisme d'activation de la voie est très similaire à celui observé pour la voie JNK, les deux voies empruntant en partie les mêmes acteurs moléculaires.

Le facteur RAS est également capable d'activer la voie p38 par l'intermédiaire de Rho de la même façon que lorsqu'il se fixe au récepteur TNF (Modur, Zimmerman et al. 1996; Teramoto, Coso et al. 1996; Ichijo, Nishida et al. 1997). Tout comme la voie JNK, la voie p38 semble donc posséder un rôle important dans l'initiation de l'apoptose des cellules en réponse à un stress oxydatif.

L'équipe de Muñoz-Cánoves a également mis en évidence un rôle important de p38 dans la régulation de différents facteurs impliqués dans la régulation de la différenciation musculaire ainsi que dans des phénomènes d'inflammation faisant intervenir les macrophages. Les capacités de p38 à modifier l'activité de facteurs comme MyoD (Lluis, Ballestar et al. 2005), NFκB (Baeza-Raja and Munoz-Canoves 2004) ou l'expression de différents gènes impliqués dans la différenciation (Lluis, Perdiguero et al. 2006), en font un acteur majeur de l'homéostasie du muscle.

- **Voie de signalisation BMK1 (ERK5) :**

La voie BMK1 est la dernière voie MAPK à avoir été découverte. Tout comme les trois autres voies MAPK, la voie BMK1 est activée lors de stress cellulaire (Kamata, Honda et al. 2005) ainsi que par certains récepteurs couplés aux protéines G (Marinissen, Chiariello et al. 1999) et certains récepteurs de facteurs de croissance comme le NGF (Kamakura, Moriguchi et al. 1999) et l'EGF (Kato, Tapping et al. 1998; Kamakura, Moriguchi et al. 1999). Différentes études ont émis l'hypothèse d'un rôle de BMK1 dans la prolifération (Kato, Tapping et al. 1998), la différenciation (Cavanaugh, Ham et al. 2001) et la survie des cellules (Cavanaugh, Ham et al. 2001). L'activation de BMK1 peut se faire par le peroxyde d'hydrogène dans de nombreux types cellulaires (Abe, Kusuhara et al. 1996). Cette activation peut nécessiter la présence du facteur Src pour certains types cellulaires. En général, l'activation redox de la voie BMK1 va conduire à un effet anti-apoptotique (Suzaki, Yoshizumi et al. 2002).

Partie V

La dystrophie myotonique de type 1

V. La Dystrophie Myotonique type I

V.1. *Généralités et symptomatologie*

a. Généralités

L'expansion de séquences répétées au niveau génomique est à l'origine de diverses pathologies. Ces répétitions peuvent se situer à différents endroits du génome. On peut ainsi les retrouver au niveau de la région codante d'un gène comme dans le cas de la Chorée de Huntington ou de la Dystrophie Musculaire Oculopharyngée. Ces mutations conduisent à la production de protéines anormales (contenant des expansions de polyglutamine ou polyalanine) qui vont se retrouver sous forme d'agrégats protéiques perturbant le métabolisme cellulaire (Orr and Zoghbi 2007). Les expansions de séquences répétées peuvent également se retrouver dans des régions non-codantes comme dans le cas de l'ataxie de Friedrich ou le syndrome du X-fragile. En effet, l'ataxie de Friedrich présente des expansions (GAA)_n dans la partie 5'UTR du gène FXN alors que le syndrome du X-fragile est caractérisé par des expansions (CGG)_n dans le premier intron du gène FMR1. Dans ces situations, la mutation conduit à un blocage de la transcription et donc à une diminution ou perte de la protéine cible. Cependant, certaines expansions de séquences répétées sont situées dans d'autres régions, non-codantes, et n'induisent pas un blocage de la transcription. Ainsi, la dystrophie Myotonique de type 1 dont la mutation (expansion de triplets CTG) se situe dans la région 3'UTR du gène de la DMPK, fait partie d'une nouvelle famille de maladie à gain-de-fonction des ARNs, parmi lesquelles on retrouve également la Dystrophie Myotonique de type 2 (DM2) qui se caractérise quant à elle, par une expansion de répétitions CCTG dans l'intron 1 du gène ZNF9 (Zinc Finger Protein 9) (Ranum, Rasmussen et al. 1998; Ricker 1999).

La dystrophie myotonique de type I (DM1) ou maladie de Steinert, fut décrite pour la première fois au début du 20^e siècle (1909) par Steinert et par Batten et Gibb (Batten and Gibb 1909). Il s'agit d'une pathologie multisystémique à transmission autosomique dominante de pénétrance complète et dont l'expression est variable selon les patients. Avec une prévalence de 1/8000^e, elle représente l'une des pathologies neuromusculaires les plus fréquentes chez l'adulte (Harper 2001). Il est également à noter que cette prévalence est très hétérogène en fonction des régions, allant de 1/25000^e en Europe à 1/500^e dans la région du

Lac Saint-Jean au Québec. Le nombre élevé de patients au sein de cette région est due à un effet fondateur (immigration d'un patient DM1 au XVII^e siècle dans cette région, isolement géographique pendant deux siècles et forte natalité) (Mathieu, De Braekeleer et al. 1990).

La DM1 est caractérisée par une atteinte multisystémique et par une grande variabilité inter- et intra-familiale des symptômes et de l'âge de leur apparition. Les principaux symptômes sont retrouvés au niveau des systèmes musculaires, endocriniens et nerveux (*tableau 1*).

Organes	Principales atteintes
Muscle lisse	Œsophage, colon, utérus (autres atteintes possibles)
Muscle squelettique	Dystrophie, myotonie
Cœur	Défauts de conduction en particulier des arrêts cardiaques, arythmie auriculaire, cardiomyopathie
Poumons	Pneumonie fréquente due aux atteintes de l'œsophage ou du diaphragme, hypoventilation alvéolaire
Système nerveux central	Hypersomnie, atteintes mentales (sévère dans la forme congénitale et légère dans la forme adulte)
Système endocrinien	Atrophie des testicules, diabète, (cliniquement variable), perturbation de l'hormone de croissance (parfois) ou d'autres fonctions de l'hypophyse
Yeux	Cataracte, dégénérescence de la rétine, ptosis, hypotonie oculaire, faiblesse des muscles extra-oculaire
Squelette	Croissance excessive des os du crâne, élargissement des sinus, atteinte de la mâchoire et du palais, scoliose, déformation des pieds
Peau	Calvitie précoce, épithélium calcifiant

Tableau 1 : Atteinte multisystémique observée chez les personnes atteintes de DM1
(d'après Harper 2001)



Figure 18 : Variation de l'apparence faciale d'une famille atteinte de DM1.

La grand-mère a une cataracte depuis l'âge de 40 ans et n'a pas de symptôme musculaire. La mère ne présentait pas de symptômes avant la naissance de son fils. Elle a ensuite développé une faiblesse modérée des muscles du visage, un affaissement des paupières et une cataracte. Son enfant est atteint de la forme congénitale. Dès sa naissance, il présentait une faiblesse importante des muscles faciaux ainsi qu'une faiblesse de la mâchoire. Photo issue de (d'après Harper 2001).

b. Les différentes formes de DM1

La DM1 est scindée en quatre formes plus ou moins distinctes classées selon l'âge d'apparition des symptômes : la forme congénitale, la forme juvénile, la forme adulte et la forme tardive dite bénigne (*figure 18*).

- **La forme bénigne** : Sous cette forme, la pathologie est considérée comme bénigne et les personnes atteintes ne présentent que peu de symptômes. Les premiers signes cliniques tels que la cataracte et la calvitie chez l'homme, n'apparaissent que vers l'âge de 50 ans. Ces deux symptômes étant particulièrement répandus chez les personnes même saines, il est difficile de les associer à la pathologie DM1 exception faite lors d'une étude génétique dans le cadre d'une famille DM1.
- **La forme adulte** : Cette forme de la pathologie est caractérisée par une apparition des premiers symptômes entre 30 et 40 ans, mais avec une certaine variabilité puisque certains d'entre eux peuvent parfois apparaître dès la fin de l'adolescence. Les principaux symptômes sont la myotonie (difficulté de relaxation du muscle après une contraction volontaire), la dystrophie (dégénérescence et faiblesse des muscles), un défaut de conduction cardiaque (90% des cas), une cataracte (100% des patients après 40 ans), des troubles endocriniens (résistance à l'insuline et hypogonadisme) et neurologiques (hyper

somnolence, dépression, ralentissement intellectuel). Ces symptômes et leurs sévérités varient énormément d'une personne à l'autre, même au sein d'une famille.

- **La forme juvénile** : Cette forme entraîne l'apparition de symptômes dès l'enfance, aux alentours de 8 à 10 ans. Les patients souffrent alors de faiblesses musculaires et de troubles cognitifs et comportementaux conduisant à des difficultés scolaires ainsi que des difficultés d'insertion au niveau social. Elle est souvent présentée comme une forme précoce de la forme adulte de la maladie. Cependant, la DM1 étant une pathologie évolutive, les symptômes observés chez un adulte présentant la forme juvénile seront beaucoup plus sévères que ceux retrouvés dans la forme adulte.
- **La forme congénitale (cDM1)** : Cette dernière correspond à la forme la plus sévère et est caractérisée par une hypotonie généralisée à la naissance. Des troubles de succion, de déglutition ainsi qu'une détresse respiratoire majeure, sont diagnostiqués dès la naissance. La sévérité de cette forme conduit à une létalité à la naissance dans 20% des cas. Les enfants survivants présentent un retard psychomoteur et mental ainsi qu'une espérance de vie réduite.

c. Mutation et mécanismes moléculaires

Le locus contenant la mutation responsable de la DM1 fut découverte en 1992, par Harley et ses collaborateurs (Harley, Brook et al. 1992). Ce locus se situe sur le chromosome 19, entre les régions 19q13.2 et 19q13.3. La mutation conduisant à la pathologie correspond à une expansion de trinuécléotides CTG dans la partie 3' transcrite mais non traduite (3'UTR : 3' UnTranslated Region) du gène codant pour la DMPK (Dystrophia Myotonica Protein Kinase) (*figure 19*).

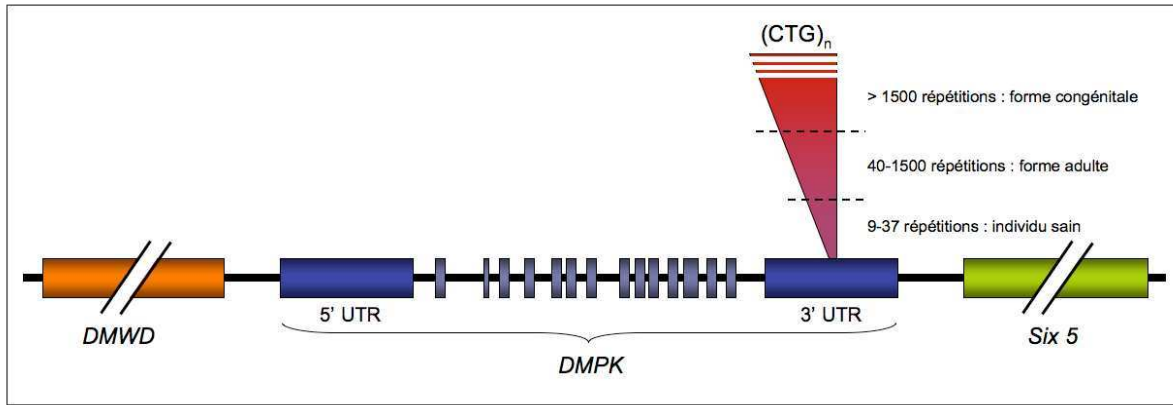


Figure 19 : Schéma du locus du gène de la DMPK (19q13.2-3) et de la mutation conduisant à la DMI.
 Les gènes DMWD (Dystrophia Myotonica containing WD repeat motif) et Six 5 (Sine oculis homeobox homolog 5) encadrent le gène de la DMPK.

C'est le nombre de répétitions de trinuécléotides CTG qui va déterminer la présence ou non de la pathologie (*tableau 2*). Dans le cas d'un individu sain, le nombre de répétitions varie de 5 à 37. Au-delà de 50 répétitions CTG, l'allèle est considérée comme pathologique (Brook, McCurrach et al. 1992; Fu, Pizzuti et al. 1992; Mahadevan, Tsilfidis et al. 1992). Globalement, la taille de l'expansion CTG va déterminer la sévérité de la pathologie et il existe une corrélation entre la taille de l'expansion, la sévérité des symptômes mais également l'âge d'apparition de ces derniers (Modoni, Silvestri et al. 2004).

Nombre de répétitions	Formes de la pathologie
$0 < (CTG)_n < 37$	Individu sain
$50 < (CTG)_n < 150$	Forme tardive bénigne
$150 < 5(CTG)_n < 1500$	Forme adulte / juvénile
$(CTG)_n > 1500$	Forme congénitale

Tableau 2 : Corrélation entre la taille de l'expansion et la forme clinique de la pathologie
 La sévérité ainsi que la précocité d'apparition des symptômes sont proportionnelles à la taille des expansions CTG.

Les expansions CTG supérieures à 50 répétitions présentent une forte instabilité, et ce dans les lignées somatiques et germinales. Cette instabilité est à l'origine de l'augmentation du nombre de répétitions au cours des générations successives (instabilité intergénérationnelle), ainsi qu'à un mosaïcisme intra- et inter-tissulaire au sein d'un même

patient (instabilité somatique). L'instabilité intergénérationnelle est responsable du phénomène d'anticipation des symptômes retrouvé dans une famille de patients DM1 et a pour conséquence une arrivée plus précoce de la maladie, ainsi qu'une aggravation notable de la sévérité des symptômes de génération en génération (Harper, Harley et al. 1992; Harper 2001).

Un modèle murin a permis de confirmer les observations réalisées chez les patients concernant l'instabilité des expansions CTG. Ce modèle fut généré à partir de l'insertion d'un fragment génomique de 45 kb contenant le gène de la DMPK humaine présentant 55 répétitions CTG. (Gourdon, Radvanyi et al. 1997). En effet, la taille de la mutation augmente progressivement au cours des générations, et il a même été observé un saut de 500 CTG au cours d'une seule génération (Gomes-Pereira, Foiry et al. 2007). L'instabilité de ces séquences répétées et l'augmentation de la taille de l'expansion, résulterait probablement d'une combinaison de multiples facteurs, à savoir un « glissement » de l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN et une défaillance du système « mismatch repair » (MMR) de réparation de l'ADN (Foiry, Dong et al. 2006).

d. Conséquences de la mutation

Les mécanismes conduisant de la mutation à l'induction des symptômes pathologiques sont complexes. Différentes hypothèses ont été proposées et étudiées afin d'expliquer et de mieux comprendre les effets en Cis et en Trans de cette mutation.

- Haplo-insuffisance de la DMPK et des gènes voisins (Effet Cis)

Il a été démontré que la présence des répétitions CTG chez des patients DM1 entraîne une perturbation dans l'expression de la protéine DMPK avec une diminution d'environ 50% de la quantité de protéine DMPK au sein des tissus affectés (Fu, Friedman et al. 1993; Furling, Lam le et al. 2003). Cette diminution n'est pas le fait d'une perturbation de la transcription de l'allèle mutée, mais résulte d'un défaut de localisation sub-cellulaire de l'ARNm contenant des expansions de répétitions CUG. En effet ces ARNm DMPK mutés sont séquestrés au sein du noyau sous forme d'agrégats nucléaires également appelés foci (Taneja, McCurrach et al. 1995; Davis, McCurrach et al. 1997), que l'on peut visualiser par

hybridation *in situ* via une sonde fluorescente contenant des répétitions CAG (technique de FISH) (figure 20).

La protéine DMPK est une sérine-thréonine protéine kinase dont les substrats endogènes sont encore mal connus mais on peut citer la lamine A/C (Barreau, Dutertre et al. 2006), le Phospholemman (Mounsey, John et al. 2000), un peptide transmembranaire ayant un rôle dans le transport des ions Na et le volume cellulaire (Mounsey, Mistry et al. 2000), ou encore la Myosine phosphatase (MYPT1) (Muranyi, Zhang et al. 2001). La DMPK possède également des co-activateurs, les membres de la famille des Rho (petites GTPase) (Shimizu, Wang et al. 2000) ainsi qu'un partenaire, HSPB2/MKBP, un membre de la famille des Heat Shock Protein (HSP) (Barreau, Watrin et al. 2006) qui pourrait avoir un rôle dans la prévention du stress oxydatif. Lors d'une étude plus récente (Forner, Furlan et al. 2010), deux nouvelles HSPs, la α B-crystallin/HSPB5 et la HSP25/HSPB1, sont apparues comme des partenaires potentiels de la DMPK. L'un des rôles de la DMPK pourrait être d'induire une réorganisation du cytosquelette d'actine ainsi qu'un phénomène pro-apoptotique de « blebbing » de la membrane plasmique (formation de bulles à la surface de la membrane plasmique) (Jin, Shimizu et al. 2000). De plus, les partenaires potentiels de la DMPK semblent suggérer un rôle de cette protéine dans les phénomènes de stress cellulaires.

La DMPK est exprimée de façon ubiquitaire avec une expression particulièrement élevée dans certains tissus tel que les muscles squelettiques, lisses et cardiaques, le cortex cérébral et le cervelet (Eriksson, Ansved et al. 2000). La diminution d'environ 50% de la quantité de protéines DMPK, du fait de la séquestration nucléaire des ARNm DMPK mutés (Taneja, McCurrach et al. 1995), ne semble cependant pas suffisante pour expliquer l'atteinte multisystémique observée dans la pathologie. En effet, l'inactivation du gène *dmpk*, dans un modèle souris, n'entraîne que de légers troubles de conduction cardiaque ainsi qu'une faible dystrophie apparaissant tardivement, mais surtout la souris DMPK hétérozygote ne présente aucun phénotype (Jansen, Groenen et al. 1996; Reddy, Smith et al. 1996).

En plus de la perturbation de l'expression de l'ARNm DMPK, la mutation CTG conduit à une modification locale de la structure chromatinienne. Cette perturbation entraîne notamment une altération de l'expression du gène en aval *SIX5* (*Sine oculis homeobox homolog 5*) (Thornton, Wymer et al. 1997; Alwazzan, Newman et al. 1999; Eriksson, Ansved et al. 2000). Cependant, des souris déficientes en *SIX5* ne présentent pas de défauts musculaires (Klesert, Cho et al. 2000; Sarkar, Appukuttan et al. 2000) suggérant un rôle mineur de cette dérégulation dans la maladie.

- Gain de fonction des ARN mutés

En 2001, un modèle de souris exprimant le gène DMPK humain contenant plus de 300 répétitions CTG, a permis de constater le développement d'anomalies similaires à celles observées dans la DM1 (Seznec, Agbulut et al. 2001) : une myotonie, une myopathie, un retard de croissance, une posture anormale ou encore une atrophie musculaire progressive (Vignaud, Ferry et al. 2010). Par ailleurs, l'impact de la présence des répétitions CTG sur la fonte musculaire a également été mis en évidence dans un modèle murin exprimant 960 répétitions CTG interrompues dans le contexte de l'exon 15 du gène DMPK (Orengo, Chambon et al. 2008). Un modèle de souris, contenant une expansion de 250 CTG dans la région 3'UTR du gène de l'actine squelettique humaine (HSA-LR), fut également développé. Tout comme les modèles précédents, ces souris reproduisent certains phénotypes observés chez les patients DM1 comme une myotonie, une myopathie ainsi que des inclusions ribonucléaires formées à partir des ARNm HSA-LR (Mankodi, Logigian et al. 2000; Kanadia, Shin et al. 2006; Wheeler, Lueck et al. 2007). Ces résultats suggèrent un rôle prépondérant des ARN mutés contenant les répétitions dans la pathologie, la localisation de la mutation ne semblant pas déterminer le phénotype observé.

Le rôle de l'effet Cis fut encore minimisé suite à la découverte d'une autre pathologie présentant un phénotype similaire à celui de la DM1 mais avec des atteintes musculaires proximales. Celle-ci fut appelée Dystrophie myotonique de type 2 (DM2). Les patients DM2 ne possèdent pas de répétitions CTG au sein du gène DMPK. En revanche, ils possèdent des répétitions CCTG au niveau de l'intron 1 du gène CNBP (CCHC-type zinc finger nucleic acid binding protein), anciennement appelé ZNF9 (Zing Finger Protein 9) (Ranum, Rasmussen et al. 1998; Ricker 1999). De la même façon que dans la DM1, les ARNs contenant les expansions CCUG, issus de l'épissage des ARN pré-messagers mutés, vont se retrouver séquestrés au sein du noyau sous forme de foci. Le fait que des symptômes similaires soient obtenus avec une mutation située sur un gène et un chromosome différents, a conforté l'hypothèse que la réduction du niveau de DMPK ainsi que l'effet Cis de la mutation CTG sur les gènes voisins, ne sont pas des facteurs déterminants dans l'apparition de la DM1 et probablement dans celle de la DM2.

- Inclusions ribonucléaires des ARN mutés

Les cellules de patients DM1 sont caractérisées par des agrégats d'ARNm DMPK mutés au sein de leurs noyaux (*figure 20*). On retrouve ces foci majoritairement dans les

cellules musculaires et neuronales des patients (Taneja, McCurrach et al. 1995; Jiang, Mankodi et al. 2004). La présence de répétitions CUG anormales entraîne une perturbation du transport des ARNm DMPK mutés vers le cytoplasme (Davis, McCurrach et al. 1997). Les expansions CUG forment des structures secondaires stables de type « hairpin » (Napierala and Krzyzosiak 1997). Ces formations d'ARN double brin vont être à l'origine de la séquestration de molécules possédant une affinité particulière pour ce type de structures. Le facteur d'épissage MBNL1 (MuscleBlind-Like 1) a notamment été décrit comme co-localisant avec les foci d'ARN (CUG)_n (Miller, Urbinati et al. 2000). La séquestration de MBNL1 entraîne une perte de fonction de ce facteur d'épissage conduisant à une altération du métabolisme et de la maturation d'autres ARN pré-messagers. On peut noter que l'inhibition de MBNL1 par ARN interférence réduit de façon significative le nombre de foci nucléaires dans des cellules DM1 (Smith, Byron et al. 2007), suggérant que leur formation est dépendante, en partie, de la présence de MBNL1 et de sa capacité de liaison aux structures secondaires formées par les répétitions CUG (Miller, Urbinati et al. 2000; Dansithong, Paul et al. 2005; Smith, Byron et al. 2007).

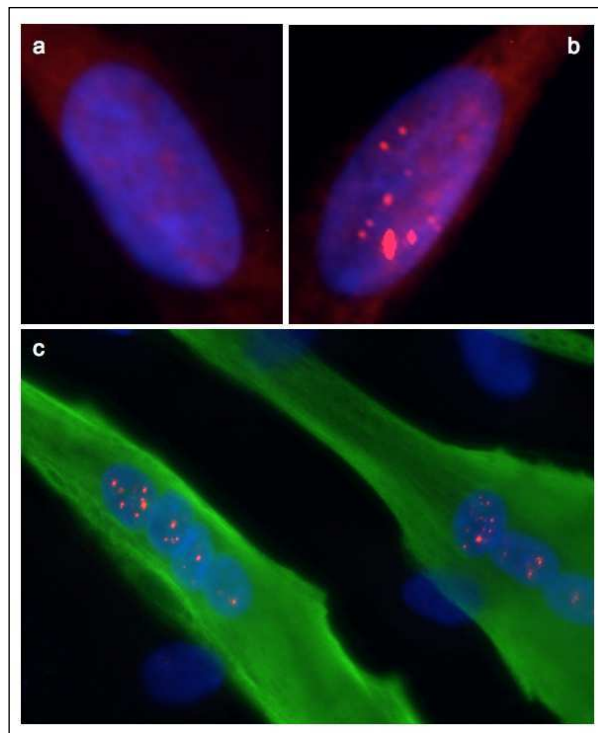


Figure 20 : Agrégats nucléaires des ARNm DMPK mutés.

Mise en évidence d'agrégats d'ARN mutés DMPK dans les noyaux de myoblastes DM1 (b), de myotubes DM1 (c) et absence des foci dans les cellules contrôles (a). Marquage des ARN mutés DMPK par hybridation in situ d'une sonde CAG7 couplée à un fluorochrome rouge (Cy3). Les myotubes sont marqués grâce à un marquage de la desmine (en vert). Coloration des noyaux au Hoechst.

- Perturbation de l'épissage alternatif (effet Trans)

La perturbation de l'activité du facteur d'épissage MBNL1 suite à l'expression d'ARNm mutés contenant des expansions CUG, entraîne une dérégulation spécifique de la maturation d'ARNm hétérologues et donc, des protéines résultantes. L'invalidation de MBNL1 dans un modèle murin a confirmé le rôle de ce facteur dans la DM1 puisque ces souris développent un phénotype DM1, avec notamment des défauts d'épissage (Kanadia, Johnstone et al. 2003; Matynia, Ng et al. 2010). Ainsi, 80% des défauts d'épissage présents dans ce modèle sont retrouvés dans les souris HSA-LR exprimant des expansions CUG qui séquestrent MBNL1 dans les foci, ceci conduisant à une perte de fonction de ce facteur d'épissage (Osborne, Lin et al. 2009; Du, Cline et al. 2010). D'ailleurs, la surexpression de MBNL1 dans le muscle de souris HSA-LR, permet de corriger les défauts d'épissage et d'abolir la myotonie (Kanadia, Shin et al. 2006), ceci confirmant le rôle de la perte de fonction de MBNL1 dans la physiopathologie de cette maladie. Cependant MBNL1 n'est pas le seul facteur dérégulé par l'expression des ARN mutés. L'activité de CUGBP1 (CELF1), autre facteur d'épissage faisant partie de la famille CELF, est également altérée dans les cellules DM1. Contrairement à MBNL1, CUGBP1 ne colocalise pas avec les foci nucléaires, et ce, malgré sa capacité de liaison aux répétitions CUG simple brin (Timchenko, Cai et al. 2001). En revanche, l'expression d'ARN mutés induit une stabilisation de la protéine CUGBP1 suite à une hyperphosphorylation via une activation anormale de la PKC (Kuyumcu-Martinez, Wang et al. 2007; Wang, Kuyumcu-Martinez et al. 2009). Ceci a pour conséquence un gain de fonction de la protéine CUGBP1 dont l'activité d'épissage est antagoniste à celle de MBNL1 pour de nombreux ARN dérégulés dans la DM1.

Dans différentes pathologies, les perturbations de l'épissage conduisent à l'apparition d'ARN anormaux entraînant la formation de protéines non fonctionnelles comme dans le cas du syndrome du X fragile (Sellier, Rau et al. 2010), ou encore l'ataxie spinocérébelleuse 8 (Daughters, Tuttle et al. 2009). Dans le cas de la DM1, la conséquence de la modification des activités de MBNL1 et CELF1 aboutit plutôt à l'expression d'un profil d'épissage fœtal dans un tissu adulte (Lin, Miller et al. 2006; Kalsotra, Xiao et al. 2008). Cet effet transdominant est relativement bien caractérisé et une quinzaine d'ARN pré-messagers, comme ceux codant pour le récepteur à l'insuline ou le canal chlore, ont été décrits comme présentant des défauts de maturation chez les patients atteints de DM1 (Philips, Timchenko et al. 1998; Savkur, Philips et al. 2001; Sergeant, Sablonniere et al. 2001; Buj-Bello, Furling et al. 2002; Charlet,

Savkur et al. 2002; Kimura, Nakamori et al. 2005). On peut toutefois noter que ce type de dérégulation peut aussi être observé lors du processus de régénération. Cependant, dans la DM1, on retrouve ces modifications dans des tissus ne se régénérant pas comme le muscle cardiaque (Philips, Timchenko et al. 1998; Wang, Chen et al. 2011) et contrairement à d'autres dystrophies musculaires, on n'observe pas de régénération massive dans le muscle DM1 (Thornell, Lindstom et al. 2009). Ainsi, l'hypothèse est que ces isoformes fœtales ne permettraient pas d'assurer les fonctions requises dans les tissus adultes (Osborne and Thornton 2006; Ranum and Cooper 2006). Dans certains cas, il est possible de faire un lien direct entre le défaut de maturation et le symptôme observé chez les patients. C'est notamment le cas pour le défaut d'épissage touchant le pré-ARNm du canal chlore muscle spécifique, qui conduit à la myotonie (Savkur, Philips et al. 2001; Charlet, Savkur et al. 2002), de celui de la Troponine T cardiaque, susceptible de provoquer des défauts de la conduction cardiaque (Philips, Timchenko et al. 1998), ou encore de celui du récepteur à l'insuline qui pourrait être associé à la résistance à l'insuline des patients (Savkur, Philips et al. 2001). Plus récemment, la dérégulation de l'épissage de l'exon 11 de BIN1 a pu être associée au phénotype de faiblesse musculaire observé dans la DM1 (Fugier, Klein et al. 2011). BIN1 est une protéine impliquée dans la formation et la maintenance des tubules-T, structures membranaires au sein du muscle qui contribuent au processus d'excitation/contraction. Cette étude a identifié l'épissage anormal de l'exon 11 de BIN1 chez les patients DM1 et mis en évidence une corrélation entre la proportion d'isoforme de BIN1 anormalement maturée et la sévérité de la pathologie. La perte de fonction de MBNL1 dans les cellules DM1 est responsable de l'exclusion de l'exon 11 de BIN1 et a pour conséquence la modification de son activité. En effet, l'exon 11, spécifique du tissu musculaire, code pour un domaine de liaison aux phospho-inositides PI5P. Son exclusion va conduire à une modification des propriétés de BIN1 et une désorganisation des tubules T qui seraient associés à la perte progressive de force chez les patients DM1.

D'autres molécules ont été suspectées de perturber les mécanismes d'épissage de certains ARNm dans le cadre de la DM1. La protéine p68 a ainsi pu être isolée par chromatographie d'affinité à l'aide de répétitions CUG pures (Laurent, Sureau et al. 2011). p68 fait partie de la famille des RNA hélicases possédant un motif DEAD. Elle est impliquée dans différents aspects du métabolisme des ARN comme la transcription, la traduction ainsi que la prise en charge, l'export et la dégradation des ARNm (Fuller-Pace 2006; Janknecht 2010).

- Mécanismes additionnels

Les gènes situés au niveau du locus DM1 peuvent être transcrits dans les deux directions (sens et antisens) (Cho, Thienes et al. 2005), mais le nombre de transcrits sens de l'ARN DMPK est plus élevé que le nombre de transcrits antisens (He, Vogelstein et al. 2008; Batra, Charizanis et al. 2010). La transcription antisens du gène codant pour la *DMPK* mutée va donc conduire à la formation d'ARN possédant des expansions CAG. Les mécanismes de régulation de ce type de transcription ainsi que l'impact de la présence des répétitions au niveau du transcrit inverse reste à être défini. Par ailleurs, il a également été montré que les répétitions CTG, tout comme les répétitions CAG, pouvaient être traduites en protéines constituées de séquences homopolymériques de type polyalanines, polyglutamines ou polyleucine (Zu, Gibbens et al. 2010), ces dernières étant susceptibles de former des agrégats protéiques et d'entraîner une toxicité cellulaire (Oma, Kino et al. 2005; Klein, Ebihara et al. 2008).

Différentes études récentes ont mis en évidence des perturbations de l'expression de microARN dans des tissus de patients DM1. Ainsi, Perbellini et al. ont observé des dérégulations de certains miRNA (diminution de miR-29b,c et miR-33 et augmentation de miR-1 et miR-335) dans des muscles de patients DM1, ainsi qu'une modification de la localisation subcellulaire des miRNA 1, 133b et 206 (Perbellini, Greco et al. 2011). Bien que miR-1 ait été montré comme ayant un rôle potentiel dans les processus de différenciation des cellules musculaires et d'excitabilité des cellules cardiaques (Latronico and Condorelli 2010), et que miR-29b et c pourraient avoir un rôle dans l'atrophie musculaire (Hirose, Nakazato et al. 2008; Murton, Constantin et al. 2008), les dérégulations de miRNA n'ont pu être rattachées à un phénotype retrouvé chez les patients DM1. En outre, ces résultats sont différents de ceux observés par Gambardella et al., avec une augmentation de miR-206 et pas de changement du taux de miR-1. Enfin, une dernière étude a montré une réduction de l'expression de miR-1 dans le tissu cardiaque des patients DM1, mais surtout un nouveau rôle de la protéine MBNL1 sur la maturation de miR-1 (Rau, Freyermuth et al. 2011). MBNL1 est capable de se fixer sur le précurseur de miR-1 et d'entrer en compétition avec LIN28, une protéine liant l'ARN et régulant l'expression de certains miRNA. En présence de MBNL1, l'urydilation du pré-miR-1 par LIN28 est impossible, permettant la maturation de miR-1. Dans des cellules DM1, la présence des expansions CUG va conduire à une séquestration de MBNL1. Le facteur LIN28 va alors se fixer sur le pré-miR-1, empêchant sa maturation. Les conséquences de l'absence de miR-1 vont être une augmentation de ses cibles comme le canal

calcique Cav1,2 dont l'expression est augmentée dans le tissu cardiaque des patients DM1. Cette altération pourrait participer aux défauts de conduction cardiaque et/ou aux arythmies présentes chez les patients DM1.

- Inhibition de la toxicité des ARN mutés

L'expression des ARN DMPK mutés comportant les répétitions CUG apparaît comme un élément central, voir causal, dans le développement de cette pathologie. La destruction des ARNm DMPK dans des myoblastes DM1 à l'aide d'ARN antisens ou de ribozymes, permet de restaurer partiellement les défauts de différenciation, d'épissage et de capture de glucose, observés initialement dans ces cellules (Furling, Doucet et al. 2003; Langlois, Lee et al. 2003). Plus récemment, le ciblage direct des expansions CUG à l'aide d'oligonucléotides CAG antisens modifiés de type morpholinos (Wheeler, Sobczak et al. 2009) et 2'Omethyl phosphorotioates (Mulders, van den Broek et al. 2009), ou des U7 snRNA (small nuclear RNA) modifiés, couplés à de petites séquences d'ARN antisens (CAG)_n (Francois, Klein et al. 2011), s'est révélé être une nouvelle approche permettant l'inhibition de la toxicité des ARNm mutants. Ces stratégies ont permis d'obtenir *in vitro*, mais également *in vivo*, une correction des défauts d'épissage, mais surtout, une abolition de la myotonie dans la souris HSA-LR. Bien que les mécanismes d'action soient encore mal définis, ce type d'approches semble être en mesure de détruire et/ou inhiber les complexes ARN-CUG/MBNL1 déjà formés, mais aussi d'empêcher leur formation, laissant entrevoir la perspective d'une piste thérapeutique pour la DM1.

V.2. Les différents modèles murins de DM1

Afin d'étudier les différents mécanismes physiopathologiques de la dystrophie myotonique de type I, plusieurs modèles de souris transgéniques ont été développés. Ces modèles ont été obtenus par différentes stratégies comme l'inactivation de gènes du locus DM1 (Jansen, Groenen et al. 1996; Reddy, Smith et al. 1996; Klesert, Cho et al. 2000; Sarkar, Appukuttan et al. 2000), l'introduction dans le génome des souris du locus DM1 humain contenant 300 CTG et dont l'expansion est instable (Seznec, Agbulut et al. 2001), l'introduction du gène humain de l'actine squelettique contenant 250 triplets CTG dans la

partie 3'UTR (Mankodi, Logigian et al. 2000), l'introduction de répétitions CTG dont l'expression est conditionnelle et tissu-spécifique (Mahadevan, Yadava et al. 2006; Kuyumcu-Martinez, Wang et al. 2007; Wang, Kearney et al. 2007; Orengo, Chambon et al. 2008), l'inactivation de MBNL1 (Kanadia, Johnstone et al. 2003) ou la surexpression de CELF1 menant à une régulation anormale de l'épissage (Koshelev, Sarma et al. 2010; Ward, Rimer et al. 2010). Ces modèles animaux développent des phénotypes différents, résumés dans le *tableau 3*, et ont permis de valider notamment l'hypothèse du gain de fonction des ARN-CUGexp dans la physiopathologie DM1 ainsi que le rôle de protéines dont l'activité est dérégulée comme MBNL1.

Modèle de souris	Phénotypes quantifiables dans les tissus cibles				Limitations	Référence
	muscle squelettique	cœur	SNC	autres		
HSA^{LR} intégration de 250 répétitions dans le gène HSA	myotonie, myopathie, accumulation de foci, sequestration de MBNL1, défauts d'épissage	pas applicable	pas applicable	pas applicable	pas de faiblesse musculaire, niveau de CELF1 normaux	Mankodi, A. et al. (2000)
EpA960 expression conditionnelle de l'exon 15 de la DMPK contenant 960 CTG	myotonie, fonctions moteur, atrophie du muscle, myopathie, accumulation de foci, sequestration de MBNL1, défauts d'épissage	défauts de conduction cardiaque, cardiomyopathie, accumulation de foci, sequestration de MBNL1, défauts d'épissage	non observé	non observé	fuite du transgène, expression dans le muscle squelettique, forte mortalité du fait de complications cardiaques	Kuyumcu-Martinez, N.M. et al. (2007) Wang, G.S. et al. (2007) Orengo, J.P. et al. (2008)
DM300 et DMSXL introduction multi-systémiques d'expansions CTG instables	myotonie, myopathie, accumulation de foci, perte de force musculaire, défauts d'épissage	accumulation de foci, défauts d'épissage	accumulation de foci, défauts d'épissage, tauopathie	accumulation de foci, défauts d'épissage	épissages anormaux limités, variabilité interindividus, temps de mise en place de l'élevage élevé	Seznec, H. et al. (2001) Vignaud, A. et al. (2010) Gomes-Pereira, M. et al. (2007) Gourdon, G., et al. (2009) Panaite, P.A. et al. (2008)
DMPK-GFP-(CTG)200 expression conditionnelle d'un transcrit GFP fusionné à la 3'UTR de la DMPK contenant 200 CTG	myotonie, myopathie, défauts d'épissage	défauts de conduction cardiaque	non observé	non observé	pas de faiblesse musculaire, pas de foci d'ARN, séquence répétées courtes, forte mortalité	Mahadevan, M.S. et al. (2006)
Mbnl1^{Δ3/Δ3} inactivation du gènes MBNL1	myotonie, myopathie, défauts d'épissage	cardiomyopathie	déficits de motivation et d'apathie	non observé	pas de faiblesse musculaire, niveau de CELF1 normaux	Kanadia, R.N. et al. (2003) Matynia, A. et al. (2010)
TRECUGBP1 surexpression conditionnelle de CUGBP1 (CELF1)	fonctions moteur, myopathie, perte de force musculaire, défauts d'épissage	défauts de conduction cardiaque, cardiomyopathie	non observé	non observé	forte mortalité	Koshelev, M. et al. (2010) Ward, A.J. et al. (2010)

Tableau 3 : Aspects moléculaires et physiopathologiques des différents modèles murins de DM1 (d'après Gomes-Pereira, Cooper et al. 2011)

V.3. Dystrophie Myotonique de type I et cellules satellites

a. Sénescence prématurée des myoblastes dans la DM1

L'un des phénotypes majeurs dans la DM1 est une atteinte musculaire plus ou moins sévère selon la taille des expansions CTG. L'analyse de biopsies musculaires révèle une importante modification de la taille des fibres musculaires avec une atrophie spécifique des fibres de type I, une centralisation des noyaux, ainsi que l'apparition de masses sarcoplasmiques. Cependant, très peu de régénération est observée dans les muscles atteints de patients DM1 alors que le nombre de cellules satellites présentes dans ces muscles est deux fois plus élevé que celui retrouvé dans des muscles DM1 non atteints ou d'individus sains (Thornell, Lindstom et al. 2009) (*figure 21*). Ce paradoxe entre une augmentation du nombre de cellules satellites, un faible taux de régénération et une atrophie progressive du muscle DM1, a conduit différentes équipes à s'intéresser aux devenir des cellules satellites, et plus particulièrement à leur capacité proliférative. En effet, la maintenance de la masse musculaire ainsi que sa réparation va être dépendante à la fois du nombre de cellules satellites présentes dans le muscle, mais également à leur capacité à se diviser.

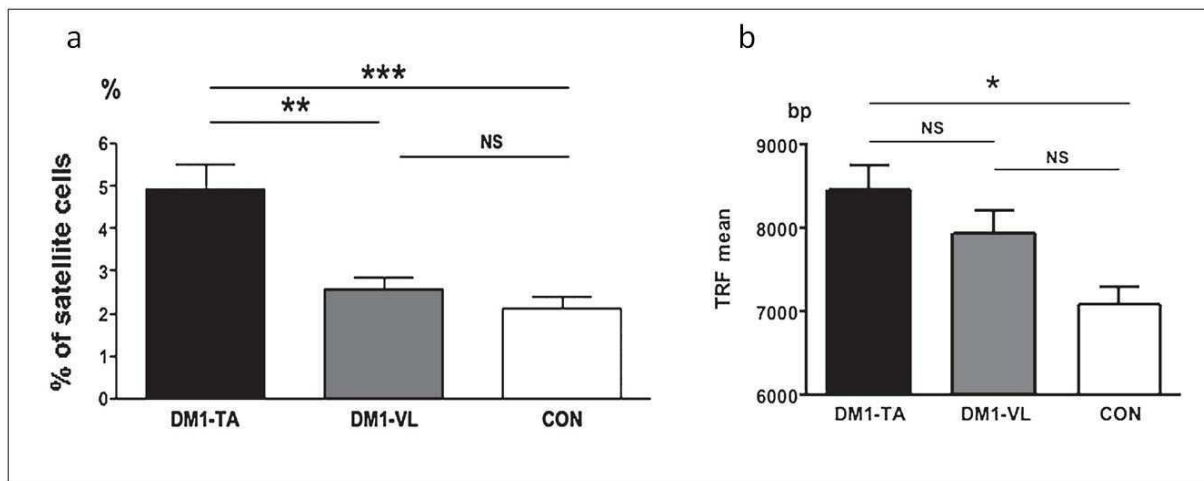


Figure 21 : Comparaison entre la proportion de cellules satellites et leur taux de prolifération

(a) Le nombre de cellules satellites augmente de façon significative dans les muscles distaux de patients DM1. (b) Parallèlement, cette augmentation n'est pas accompagnée d'une baisse significative de la taille des télomères suggérant que celle-ci n'est pas associée à un turnover plus important des cellules. (d'après Thornell, Lindstom et al. 2009)

Une étude du laboratoire a permis de mettre en évidence que les cellules satellites provenant de patient souffrant de la forme DM1 congénitale avec de grandes expansions CTG (>2000 répétitions), présentaient une capacité proliférative réduite de 40% par rapport aux cellules contrôles (Furling, Coiffier et al. 2001) (*figure 22*). Ces cellules satellites ont été isolées à partir de biopsies musculaires puis cultivées dans des conditions identiques jusqu'à atteindre leur limite de prolifération respective. Cette limite est considérée comme atteinte lorsque les cellules stoppent leur prolifération en présence de mitogènes pendant trois semaines. Elles entrent alors dans une phase d'arrêt irréversible du cycle, la sénescence. Au moment de leur arrêt prolifératif, les myoblastes contrôles et DM1 présentent des phénotypes similaires. On retrouve la morphologie typique des cellules en sénescence : augmentation de la taille du cytoplasme et étalement des cellules, mais on note également la présence d'une activité β -galactosidase et une augmentation des niveaux de cycline D1. De plus, la protéine Rb est retrouvée sous sa forme hypo-phosphorylée dans les deux types de cellules au moment de leur arrêt prolifératif. Ces différents résultats suggèrent que le mécanisme d'arrêt prolifératif des myoblastes DM1 est similaire à celui observé dans les myoblastes contrôles en sénescence, bien que cet arrêt prolifératif soit précoce dans les myoblastes DM1.

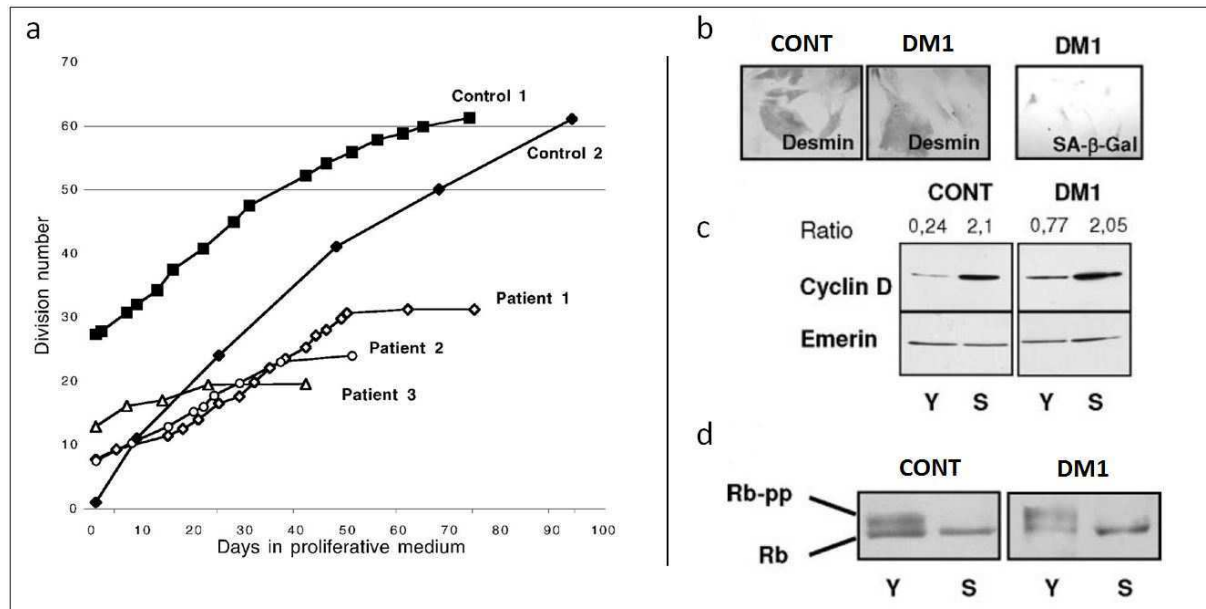


Figure 22 : Comparaison des caractéristiques des myoblastes contrôles et DM1

Malgré une diminution d'environ 40% de leur capacité proliférative par rapport aux cellules contrôles (a), les myoblastes sénescents DM1 présentent le même type de morphologie que les myoblastes contrôles (b). De plus, la sénescence de ces deux types de cellules est caractérisée par une augmentation du taux de Cycline D (c), ainsi qu'une hypo-phosphorylation de pRb (d). (d'après Furling, Coiffier et al. 2001; Bigot, Klein et al. 2009)

b. Implication de la voie télomères dépendante ?

Dans certaines pathologies neuromusculaires comme la myopathie de Duchenne, on observe *in vivo*, une succession de cycles de dégénérescence/régénération, conduisant à l'épuisement de la capacité proliférative des cellules satellites, et donc de celle des myoblastes isolés en culture à partir de biopsies de ces patients. Ces cycles ont pour conséquence une diminution de la taille des télomères ces derniers atteignant une taille critique, la conséquence étant une activation de la voie p53 aboutissant à un arrêt du cycle cellulaire. Afin de vérifier si ce type de phénomène est responsable de l'arrêt prématuré des myoblastes isolés de patients DM1, la taille des télomères a été mesurée dans des cellules contrôles et DM1. De façon surprenante, il en est ressorti que les cellules DM1 s'arrêtaient avec des télomères plus longs que ceux des cellules contrôles (8,7kb pour les cellules DM1 contre 7,4kb pour les cellules contrôles). Ce résultat suggère que les cellules DM1 n'ont pas épuisé leur capacité proliférative, et qu'un mécanisme indépendant de la voie « télomérique » intervient dans l'arrêt précoce des cellules contenant des répétitions CTG (Bigot, Klein et al. 2009).

c. Implication de la voie p16-INK4a

En 2007, Zhu & col. ont montré l'implication de la voie de stress p16^{INK4A} dans la sénescence des myoblastes humains (Zhu, Mouly et al. 2007). L'expression de p16 a été quantifiée dans les cellules contrôles et DM1. Un niveau similaire de p16 a été mesuré dans les deux types de cellules au moment de leur entrée respective en phase de sénescence indiquant que l'arrêt précoce des myoblastes DM1 est sûrement lié à une activation précoce de la voie p16^{INK4A}. L'implication de p16 a été confirmée suite à la surexpression de son ligand naturel Cdk4 dans les cellules DM1 (Bigot, Klein et al. 2009). En effet, les cellules DM1 dont l'activité de p16 est inhibée, retrouvent une capacité proliférative équivalente à celle observée dans les cellules contrôles ne surexprimant pas Cdk4. A l'inverse, une expression forcée de p16^{INK4A} dans des cellules en phase de prolifération exponentielle entraîne un arrêt précoce et irréversible. Ces différents résultats valident le rôle primordial de l'inhibiteur p16 dans l'arrêt prématuré des myoblastes de patients DM1.

On peut à noter que l'expression de Cdk4 dans les cellules contrôles permet aussi d'augmenter leur capacité proliférative, et que les myoblastes contrôles ou DM1 surexprimant

Cdk4 entrent en sénescence avec une longueur de télomères de 6 kb. Cette taille de télomères correspond à la taille critique décrite pour les fibroblastes humains, ces derniers pouvant être immortalisés par simple expression de la télomérase, contrairement aux myoblastes humains chez qui cette immortalisation nécessite, en plus, la neutralisation de p16 (Zhu, Mouly et al. 2007). Malgré la surexpression de Cdk4, les myoblastes DM1 effectuent moins de divisions que les contrôles, suggérant une perturbation de la régulation des télomères dans les cellules DM1.

d. Augmentation de la perte télomérique

L'analyse de la taille des télomères au cours de la vie proliférative des myoblastes contrôles et DM1, indique que la perte d'ADN télomérique par division est augmentée de 60% dans les cellules DM1 en comparaison des cellules contrôles (respectivement 172pdb contre 108pdb). Afin de vérifier si cette perte excessive pouvait avoir une incidence sur l'arrêt précoce des cellules DM1, la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT) a été ré-exprimée dans ces cellules, empêchant ainsi l'érosion des télomères. Malgré cela, les cellules DM1 exprimant hTERT n'ont pas effectué plus de divisions, minimisant ainsi l'implication de la perte télomérique accélérée dans l'activation précoce de la sénescence des cellules DM1 *in vitro*. De plus, cet excès de perte des télomères, qui serait reconnue comme un signal de cassure de l'ADN, ne perturbe pas l'expression de p53, suggérant que l'arrêt prolifératif est indépendant d'une taille critique des télomères (Bigot, Klein et al. 2009).

L'activation prématurée de p16 dans les cellules DM1 apparaît donc comme la voie responsable de l'arrêt précoce de ces cellules. Cependant, le mécanisme qui va conduire à cette activation n'est pas connu.

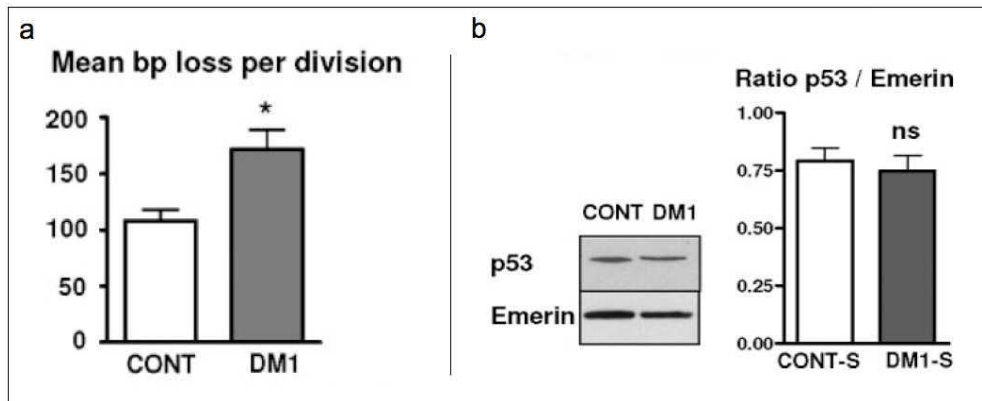


Figure 23 : Augmentation de la perte télomérique dans les cellules DM1 et impact sur l'activation de la voie p53

(a) Les cellules DM1 présentent une augmentation significative de la perte télomérique par rapport aux cellules contrôles. (b) Cette modification de perte télomérique n'entraîne pas de surexpression de p53 dans les cellules DM1 en sénescence. (d'après Bigot, Klein et al. 2009)

V.4. DM1 et sensibilité au stress oxydatif

Les dommages résultants d'un stress oxydatif, ont été impliqués dans différents processus comme le vieillissement cellulaire (Martin, Austad et al. 1996) ou des pathologies neuro-dégénératives comme la maladie de Parkinson (Schapira 1995), le syndrome de Down (Busciglio and Yankner 1995), la maladie d'Alzheimer (Markesbery 1997) ou encore la sclérose latérale amyotrophique (Ferrante, Browne et al. 1997).

Des pathologies musculaires comme la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ou la dystrophie musculaire de Becker (DMB), caractérisées par une insuffisance en dystrophine, présentent également une augmentation du niveau de stress oxydatif dans des modèles animaux (Ragusa, Chow et al. 1997; Disatnik, Dhawan et al. 1998) ainsi que chez l'Homme (Haycock, MacNeil et al. 1996), et ce, avant même l'apparition des signes de dystrophie (Disatnik, Chamberlain et al. 2000).

L'hypothèse d'une sensibilité accrue au stress oxydatif des cellules exprimant la mutation DM1, fut proposée par Usuki et Ishiura (Usuki and Ishiura 1998). Dans leur étude, ils ont comparé le comportement de cellules musculaires murines C2C12 exprimant le gène DMPK humain avec 5 (MtPK₅) ou 46 répétitions CTG (MtPK₄₆). Ils ont constaté une augmentation de la sensibilité à un stress oxydant des cellules MtPK₄₆ par rapport aux cellules MtPK₅ (Usuki and Ishiura 1998). De plus, une exposition prolongée à un agent oxydant active un mécanisme d'apoptose dans ces cellules MtPK₄₆ contrairement aux cellules MtPK₅. Ces résultats suggèrent une corrélation entre la présence d'expansion de répétitions CTG et une

sensibilité accrue des cellules au stress oxydatif. Ces résultats furent confirmés par la même équipe sur des cellules sur-exprimant le gène DMPK humain avec 60 et 160 répétitions CTG (Usuki, Takahashi et al. 2000). Ainsi, l'augmentation du nombre de répétitions CTG est associée à une sensibilité accrue des cellules au stress oxydatif.

Par ailleurs, des études ont cherché à déterminer si les paramètres associés à la balance oxydative, à savoir dommages oxydatifs sur les macromolécules et niveaux des défenses anti-oxydantes, étaient altérés chez les patients DM1. L'étude réalisée par Ihara et ses collaborateurs conclut à une augmentation des radicaux libres, des peroxydes lipidiques ainsi qu'à une diminution des antioxydants dans des échantillons sanguins de patients atteints de DM1 (Ihara, Mori et al. 1995). En revanche, une autre étude, réalisée par Rodriguez et Tarnopolsky, montre que les concentrations de 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) dans l'urine des patients DM1 ne sont pas significativement différentes de celles retrouvées chez les individus sains (Rodriguez and Tarnopolsky 2003). Enfin, un travail plus exhaustif de Toscano et ses collaborateurs sur des échantillons sanguins d'individus contrôles, de patients DM1 et de patients souffrant d'autres types de pathologies myotoniques, montre que les niveaux de Super Oxyde Dismutase (SOD), de malondialdéhyde (MDA), de vitamine E, de radicaux hydroxyle (OH) ainsi que le statut global des antioxydants, sont augmentés chez les patients DM1 (Toscano, Messina et al. 2005). Ces résultats renforcent l'hypothèse d'un rôle potentiel du stress oxydatif dans la physiopathologie de la DM1.

Objectif de l'étude

Déterminer les mécanismes impliqués dans l'activation précoce de la voie p16 dans la Dystrophie Myotonique de type 1.

La capacité proliférative des cellules satellites est déterminante dans les phénomènes de croissance, de réparation et de régénération des fibres musculaires. Contrairement à d'autres pathologies neuromusculaires comme la Dystrophie Musculaire de Duchenne, pour laquelle on constate un épuisement de la capacité proliférative de ces cellules suite à un nombre excessif de cycles de dégénérescence/régénération des fibres, la DM1 est caractérisée par une réduction de la capacité proliférative des cellules satellites en l'absence de signes évidents de régénération. Le modèle de cultures primaires de cellules satellites isolées à partir de biopsies d'individus sains et porteurs de la mutation, a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cet arrêt réplcatif prématuré. La voie de stress cellulaire conduisant à l'activation du facteur p16^{INK4A} est apparue comme responsable de l'arrêt prolifératif précoce observé dans les myoblastes DM1. Mais les mécanismes de régulation de la voie p16 sont nombreux et peuvent se faire tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau post-transcriptionnel. Le mécanisme conduisant à une augmentation prématurée de p16, et donc à une réduction de la capacité proliférative des cellules DM1, n'est pas encore identifié. Parallèlement, différentes études ont permis de démontrer une sensibilité accrue au stress chez les patients DM1, celle-ci étant dépendante de la taille des expansions CTG (Usuki and Ishiura 1998; Usuki, Takahashi et al. 2000; Toscano, Messina et al. 2005).

Partant de ces observations et sachant que la voie p16 pouvait être activée lors de différents types de stress, nous avons émis l'hypothèse d'une implication du stress oxydatif dans l'activation précoce de la voie p16 dans les myoblastes DM1 et dans la réduction de leur capacité proliférative.

Le but de la première partie de cette étude est de confirmer la différence de sensibilité des cellules DM1 face au stress oxydatif et de déterminer l'impact et le rôle de celui-ci dans l'arrêt prolifératif précoce des cellules, ainsi que les voies moléculaires impliquées dans la régulation de p16. Pour cela, le comportement de myoblastes contrôles et DM1, a été étudié dans différentes conditions permettant une modification des niveaux de stress oxydatif. Le second objectif de cette étude est de déterminer les liens existant entre le stress oxydatif, l'activation précoce de p16 et les voies moléculaires impliquées dans sa régulation, et l'expression de répétitions CTG. Dans ce but, un modèle de myoblastes DM1 inductible a été développé et caractérisé. Nous avons ensuite pu définir certaines des conséquences directes de l'expression des répétitions CTG. Enfin, le troisième objectif de ces travaux est de vérifier l'impact de l'expression des répétitions CTG au sein d'un organisme vivant.

Matériels & méthodes

Culture cellulaire

Les cellules satellites contrôles et DM1 ont été isolées à partir de biopsies musculaires comme décrit précédemment (Bigot, Klein et al. 2009). Des explants ont été réalisés à partir de biopsies de muscle. Les biopsies ont été dissociées en morceaux de petite taille de façon mécanique, dans du milieu F10 puis centrifugées afin de culotter les explants. Ces derniers sont ensuite repris dans une solution de sérum de veau fœtal (SVF) pur. Les morceaux ainsi obtenus ont ensuite été déposés dans des boîtes de cultures sous forme de gouttes afin que les explants soient en mesure d'adhérer à la surface de la boîte. Une fois les explants fixés, on ajoute un milieu de culture (F10 SVF 20% + 5µg/ml gentamycine) (Life Technologies). Des myoblastes migrent alors hors de ces explants. Ces derniers sont alors éliminés, et les cellules adhérentes peuvent être récupérées par trypsination. On les considère alors à leur première division. En cas de myogénicité faible, vérifiée par immunocytochimie grâce à un anticorps dirigé contre la desmine, le tri des cellules myogéniques a été effectué à l'aide d'un kit MACS (Milteny) permettant un isolement des cellules CD56+. Les cellules ont ensuite été cultivées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le taux d'oxygène peut être modifié selon les besoins. En conditions standards, celui-ci est de 19% (pourcentage atmosphérique), et peut être réduit à des taux compris entre 5 et 3%. En deçà, les conditions sont considérées comme hypoxiques. Les cellules satellites sont cultivées dans un milieu de prolifération F10 Ham (Life Technologies) supplémenté de 20% de SVF, contenant 5µg/ml de Gentamycine. Dans le cas des cellules HEK 293T, le milieu de prolifération correspond à du DMEM supplémenté de 10% de SVF et de gentamycine. Lorsque les cellules atteignent une confluence d'environ 80%, elles sont trypsinées jusqu'à ce qu'elles se décollent, puis reprises dans du milieu de prolifération contenant du sérum afin d'inhiber l'activité de la trypsine. Les cellules ainsi récupérées sont comptées à chaque passage afin de déterminer le nombre de divisions effectuées, calculé selon la formule : $\text{Log}(N/n)/\text{Log}2$, N représentant le nombre de cellules comptées et n le nombre de cellules ensemencées au départ. La capacité proliférative maximale des cellules est considérée comme atteinte lorsque celles-ci ne se divisent plus pendant une période de 3 semaines en milieu de prolifération. Elles sont alors considérées en arrêt prolifératif.

La collecte des cellules s'effectue par grattage dans du PBS 1X froid. Elles sont ensuite récupérées puis centrifugées 5 minutes à 250g. Le culot obtenu est ensuite mis à sec pour être congelé immédiatement à l'aide de carbo-glace et stocké à -80°C.

Traitements des cellules

Stress oxydatif – peroxyde d'hydrogène :

L'induction du stress oxydatif dans les cellules est réalisée par addition de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Sigma) au milieu de culture. Le traitement est effectué dans du milieu F10 privé de sérum à des concentrations variables d'H₂O₂ pendant une heure à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées une fois au PBS 1X puis replacées en milieu de prolifération (F10 20%SVF) pendant 48 heures.

Transfection des cellules :

La transfection de plasmides dans les cellules est effectuée grâce à la Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Les cellules sontensemencées en plaque 6 puits à environ 70% de confluence. Le lendemain, elles sont mises en contact avec un mélange de plasmide (4µg/puit) et de Lipofectamine (10µl/puit) et d'OptiMEM (Life Technologies), dans un milieu sans antibiotique pendant 5 heures. Le milieu est ensuite remplacé, les cellules pouvant ensuite être traitées, récupérées ou fixées selon les besoins après 24 ou 48 heures.

Transduction des cellules par lentivirus :

La transduction des cellules par les différents lentivirus utilisés au cours de cette étude a été réalisée selon un protocole strict. Les cellules sontensemencées selon les besoins en puits de 15 ou 35 mm de diamètre au jour J0 à une confluence d'environ 70% (soit respectivement 20000 et 100000 cellules). Le lendemain, 20µl de lentivirus pSin-960CTG inductibles, à une concentration de $4,6 \times 10^7$ Vg/ml, sont dilués dans un volume minimum de milieu F10 10% sérum sans antibiotiques, supplémentés par 8µg/ml de polybrène (Sigma) (200µl pour les puits de 15mm, 500 µl pour les puits de 35mm). Après élimination de l'ancien milieu, ce mélange est réparti sur les cellules, celles-ci étant replacées à 37°C pendant 5 à 6 heures. Ce temps d'incubation terminé, on rajoute 0,5 ou 1,5ml de milieu F10 20% SVF selon la taille des puits. Après une nuit à 37°C, ce milieu est éliminé puis remplacé par du milieu frais. Après quelques jours de récupération, une deuxième transduction est réalisée selon le même protocole.

Induction par la doxycycline :

Les cellules transduites ou transfectées par le plasmide contenant les grandes répétitions CTG (pSin-960CTG inducible), doivent être soumises à un traitement à la doxycycline (Dox) afin d'induire la production d'ARN 960CTG. La Dox est donc ajoutée directement au milieu de culture des cellules à une concentration finale de 4µg/ml de milieu.

Extraction d'ARN

Les extractions des ARN ont été réalisées à l'aide d'un kit d'extraction Trizol Reagent (Life Technologies).

Les culots cellulaires sont repris dans 1ml de Trizol Reagent et laissés à température ambiante (TP) pendant 5 minutes (dissociation des nucléoprotéines). 200µl de chloroforme sont ensuite ajoutés. Le mélange est alors fortement agité pendant 30 secondes, laissé au repos 3 minutes puis centrifugé 15 minutes à 12000g et 4°C. On transfère ensuite dans un nouveau tube la phase aqueuse à laquelle on ajoute 500µl de propan-2-ol (isopropanol). Après avoir été agité, le mélange est laissé à TP pendant 10 minutes puis centrifugé 10 minutes à 12000g et 4°C. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot d'ARN obtenu est lavé une ou deux fois à l'éthanol 75%. Le culot est ensuite séché à l'air afin d'éliminer toute trace d'éthanol, repris dans 20µl d'eau RNase free puis chauffé pendant 10 minutes à 55-60°C. Les ARN sont ensuite dosés grâce à un Nanodrop et conservés à -80°C.

RT-PCR

La transcription inverse des ARN en ADNc est réalisée grâce à un kit MLV (Life Technologies). Elle est effectuée sur 1µg d'ARN, à l'aide d'amorces aléatoires et d'amorces oligo dT à 37°C pendant 1 heure.

L'expression de différents ARN a ensuite été mesurée par PCR selon les conditions suivantes :

p16^{INK4A} :

primer sens : 5' TGGAGCCTTCGGCTGACTGGCTGGC 3'

primer anti-sens : 5' CTACGAAAGCGGGGTGGGTTGT 3'

31 cycles, TM = 62°C

SERCA1 :

primer sens : 5' ATCTTCAAGCTCCGGGCCCT 3'

primer anti-sens : 5' CAGCTCTGCCTGAAGATGTG 3'

30 cycles, TM = 55°C

GAPDH :

primer sens : 5' AAGGTGAAGGTCGGAGTCAACGG 3'

primer anti-sens : 5' TGACAAGCTTCCCGTTCTCAGCC 3'

21 cycles, TM = 60°C

B2M :

primer sens : 5' CTCTCTTTCTGGCCTGGAGG 3'

primer anti-sens : 5' TGCTGGATGACGTGAGTAAACC 3'

25 cycles, TM = 60°C

Les différents amorces de PCR ont toutes été choisies afin d'amplifier des séquences spécifiques basées sur les informations de la «Nucléotide Data Bank» de NCBI.

Les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide d'un mélange préétabli (ReddyMix Master, Thermoscientific) contenant les dNTP, la Taq DNA polymérase ainsi qu'un produit de dépôt, dans un volume de 25µl. Les produits de PCR sont déposés sur gel d'agarose 1% TBE 1X. La quantification des produits PCR est effectuée à l'aide du logiciel Quantity One (Biorad).

RT-qPCR miRNA-24

L'analyse des miRNA a été effectuée à l'aide d'un kit de transcription inverse miScript (Qiagen), d'oligonucléotides et de précurseurs spécifiques miScript (Qiagen) ainsi que du kit PCR miScript Sybr green (Qiagen). Les PCR sont réalisées grâce à un Lightcycler 480 (Roche) dans les conditions suivantes : 15min à 94°C, suivies par 50 cycles de 15sec. à 94°C, 20sec. à 55°C et 20 sec. à 72°C. Le snRNA U6 est utilisé comme standard. Les données recueillies ont été analysées grâce au logiciel d'analyse du Lightcycler 480 et par la méthode $2\Delta Ct$.

Extraction protéique

Les protéines ont été extraites à partir des culots cellulaires à l'aide d'un tampon d'extraction RIPA (NaCl 150mM, Hepes pH 7,4 50mM, 1% NP-40, 0,5% Sodium Déoxycholate, 0,1% SDS, EDTA 5 mM, Inhibiteurs de protéases, Inhibiteurs de phosphatases) puis soniquées, placées 5 minutes à 100°C et centrifugées 5 minutes à 12000rpm. Une fois les surnageants récupérés, les protéines totales sont dosées par une technique de BCA (Bicinchoninic Acid) à l'aide d'un kit (Pierce) et sont conservés à -20°C.

Western blot

On additionne un volume de tampon Leammli 2X (glycérol 22%, SDS 5%, Tris 140mM, Bleu de Bromophénol, β -mercaptoethanol 10%) aux extraits protéiques. Ces extraits sont bouillis pendant 5 minutes avant dépôts sur gel de polyacrylamide 4-12% (Life Technologies). La migration est effectuée à 180V pendant une heure environ, puis les protéines sont transférées sur membranes de nitrocellulose ou PVDF (1h, 100V, TP ou O/N, 30V, 4°C). Après un rinçage à l'eau, l'efficacité du transfert est vérifiée par coloration des protéines au rouge Ponceau. Les membranes sont ensuite équilibrées dans le TBS 1X. Les types de blocage des sites aspécifiques et les conditions de marquage varient en fonction des anticorps utilisés :

Anticorps, Marque, Type	Conditions de blocage	Dilution Ac I ^{aire}
p16 ^{INK4A} (Epitomics) Rabbit	TBS-tween 1% BSA	1/1000 ^e
Phospho-p38 (AbCAM) Rabbit	TBS-tween 3% BSA	1/1000 ^e
Phospho-Erk1/2 (AbCAM) Mouse	TBS-tween 4% lait	1/1000 ^e
Phospho-PKC (Cell Signaling) Rabbit	TBS-tween 5% BSA	1/1000 ^e
AUF1 (Upstate) Rabbit	TBS-tween 5% lait	1/1000 ^e
β -tubuline (Sigma) Mouse	TBS-tween 5% lait	1/2000 ^e

La révélation des marquages est effectuée grâce à des kits ECL Western Pico (Pierce) ou immobilon (Millipore). La visualisation ainsi que la quantification des signaux est effectuée grâce un transilluminateur G:box (Ozyme) et son logiciel de mesure (Genetools, Ozyme).

RNA-FISH

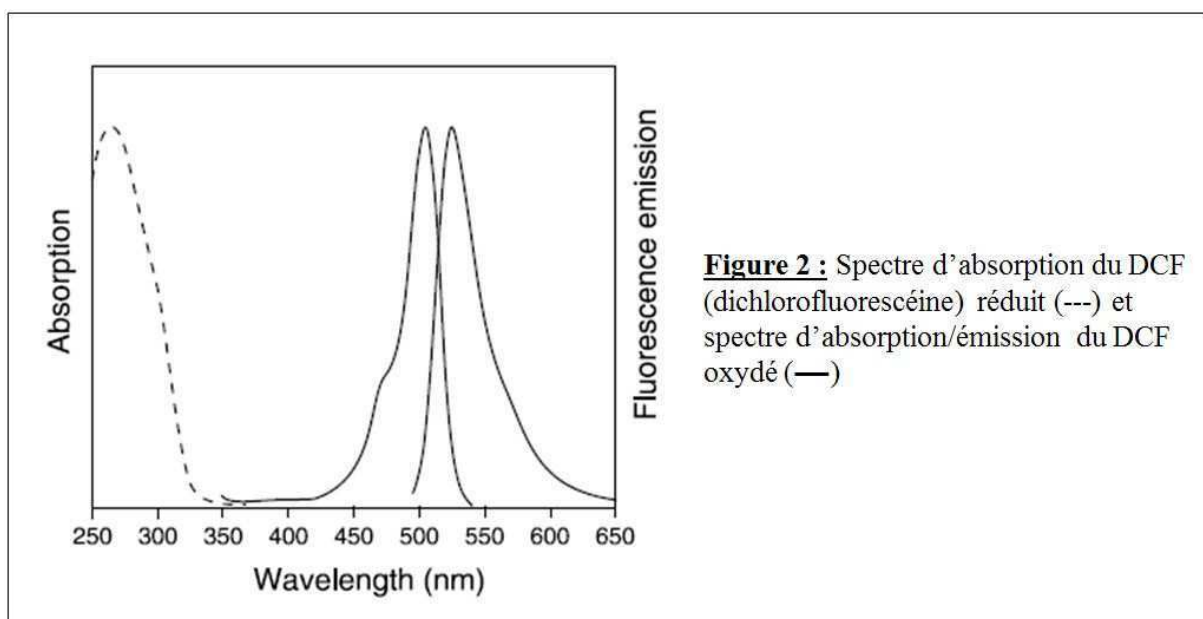
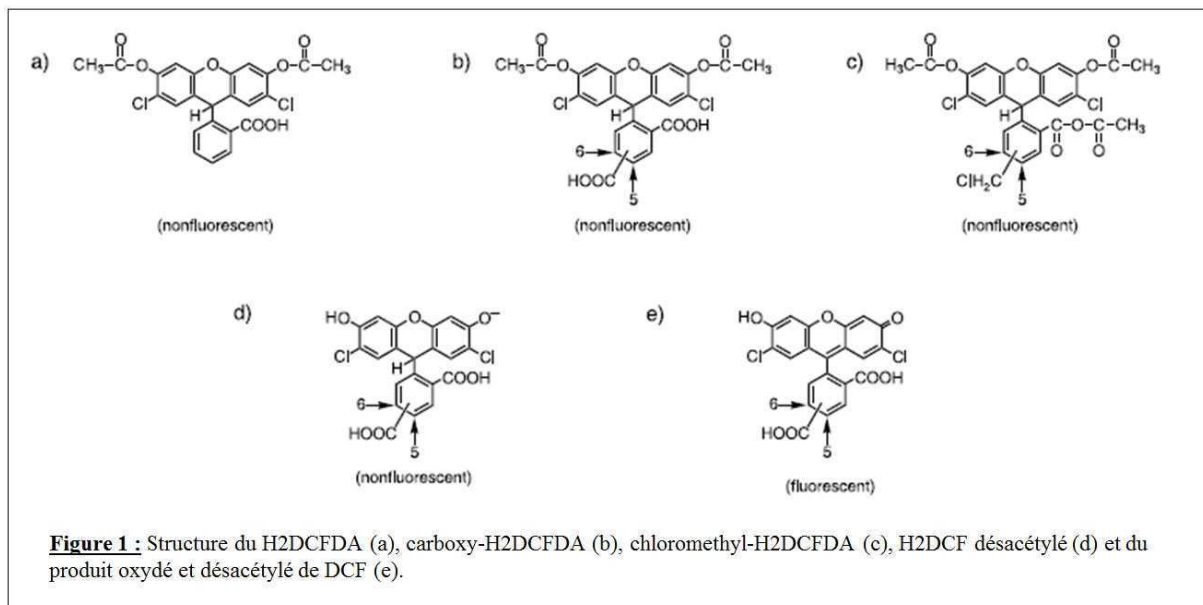
La technique de FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) est basée sur l'hybridation d'une séquence d'ARN spécifique marquée au Cy3 sur une séquence cible. Elle permet de marquer de façon spécifique les agrégats d'ARN contenant les expansions CTG caractéristiques de la DM1.

Le protocole est basé sur celui établi par Taneja et al. (Taneja, McCurrach et al. 1995). Après une fixation des cellules par une solution de paraformaldéhyde 4% (PFA), les membranes cellulaires sont perméabilisées par l'éthanol à 70%. Le marquage des cellules est fait grâce à un tampon d'hybridation constitué de 40% de formamide, 2X SSC, 0,2% BSA, contenant la sonde PNA au 1/1000^e. Ce marquage est effectué dans une chambre humide saturée en formamide à 37°C pendant 90 minutes. Après plusieurs rinçages au PBS-tween 0.1%, les noyaux sont marqués au Hoechst et les lamelles sont montées sur lame.

Quantification des ROS : technique DCF

Principe

On charge les cellules avec un dérivé réduit et acétylé de la fluorescéine le 2', 7'-dichlorofluorescéine (DCF). Ce composé est non fluorescent jusqu'à ce que son groupe acétate soit retiré par des estérases intracellulaires et que l'oxydation se produise au sein de la cellule (*figures 1 et 2*). Le clivage des groupes lipophiles donne naissance à une forme chargée de la sonde qui est imperméante. L'oxydation de la sonde peut être détectée en suivant l'augmentation de fluorescence avec un cytomètre en flux, un fluorimètre, un lecteur de microplaques, ou un microscope à fluorescence, en utilisant des sources d'excitation et des filtres appropriés pour la fluorescéine (FITC).



Protocole

Les cellules sont mises en culture sur des lamelles en verre de 18 mm recouvertes de gélatine. Chaque lamelle fut ensuite placée dans un puits propre contenant 20 μ M de DCF-AM (solution stock -20 °C, 10 mM dans DMSO) dilué dans du NPS pré-chauffé (37 °C). Le chargement des cellules est effectué durant 30 min à 37 °C. Après le chargement, les cellules sont rincées 2 fois avec du NPS préchauffé ne contenant pas DCF et incubées 15 min pour permettre une désestérification complète du DCF-AM dans le cytosol.

Acquisition

Après chargement et désestérification, les lamelles sont placées dans une chambre expérimentale (Warner Instruments) dans laquelle elles forment le fond. La chambre est placée sur la platine d'un microscope inversé (Olympus X70) relié à système d'acquisition en fluorescence. Les paramètres suivants ont été utilisés: Temps d'exposition: 20 ms/ Longueur d'onde pour excitation: 492-495 nm/ Longueur d'onde pour émission: 517-527 nm/ Acquisition en mode time-lapse (10 acquisitions toutes les 10 secondes par cellules)

Analyse

L'augmentation de fluorescence mesurée au cours du temps, est exprimée en fonction de F0 (fluorescence initiale, mesurée au début de chaque enregistrement) et soustraite du bruit de fond selon la formule suivante: $\Delta F = (F - FBF) / ((F_0 - FBF) - 1)$, où F est la fluorescence mesurée dans une cellule à l'instant t, F0 est la fluorescence mesurée dans la même cellule au début de la séquence d'acquisition et FBF la fluorescence liée au bruit de fond mesurée dans une zone où il n'y avait de cellule. La relation de fluorescence au cours du temps est approximée à l'aide d'une régression linéaire. La pente ainsi calculée est utilisée comme le taux d'oxydation normalisé du DCF au cours du temps.

Contrôle positif

Afin de créer des contrôles positifs, l'activité oxydative a été stimulée grâce au tert-butyl-hydroperoxyde (t-BHP) à une concentration finale de 100mM, permettant de mesurer la quantité de ROS en présence de cet activateur ainsi que la capacité de récupération des cellules après ce stress induit.

Clonage

La création du plasmide contenant la séquence de 960 répétitions CTG sous contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline, a été réalisée à partir de deux constructions préexistantes. La première, appelée DT960, nous a ainsi permis de récupérer la séquence des 960 répétitions CTG (développée par le Dr Cooper). Ces répétitions de triplets CTG sont interrompues par de courtes séquences CTCGA toutes les 20 répétitions afin de faciliter la réplication de ces séquences par les bactéries. Après digestion enzymatique et purification sur gel d'agarose grâce au kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), cette séquence a été placée dans un second vecteur. Cette seconde construction, TMPrtTA (Barde, Zanta-Boussif et al. 2006), permet la production de lentivirus, mais également de placer notre séquence d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur inductible par la doxycycline. La construction a été effectuée grâce à différentes enzymes de restriction et de ligation (New England Biolabs). Elle a été ensuite clonée au sein de bactéries compétentes STBL2 (Life Technologies) à haute-fidélité ayant subi un choc thermique (42°C puis 4°C) suivit d'une pré-culture à 32°C dans un milieu enrichi (Life Technologies). Les bactéries sont ensuite étalées sur gélose LB agar contenant de l'ampicilline (Life Technologies) et placées à 32°C sur la nuit. Les différentes colonies sont récoltes et mises en culture. Les plasmides obtenus après extraction d'ADN sont testées par différents enzymes de restriction. Les colonies dont le plasmide présente un profil de digestion correct ont été réamplifiées par maxi-cultures desquelles sont extraits les ADN plasmidiques à l'aide d'un kit NucleoBond® Xtra Maxi EF (Macherey Nagel). Après dosage au nanodrop de la production de plasmide, le profil de digestion de ce plasmide a, une nouvelle fois, été vérifié. Une fois ces vérifications effectuées, la production de lentivirus a pu être réalisée via une collaboration.

Immunofluorescence sur coupes musculaires

- Réalisation des coupes :

Les coupes musculaires ont été réalisées à partir de Tibialis Antérieurs (TA) prélevés après sacrifice des souris injectées par l'AAV-dt960. Une fois le prélèvement effectué, les muscles sont montés sur liège puis congelés dans de l'isopentane refroidit à l'azote. Les coupes sont réalisées au cryostat à une température de -24°C à une épaisseur de 10µm. Les

coupes de muscles sont placées sur lame, séchées sous hotte pendant 1 heure puis stockées à -80°C.

- Marquage des coupes :

Après décongélation, les sections de muscle sont séchées sous hotte pendant 30 minutes, puis fixées grâce à une solution de Paraformaldéhyde 4% (PFA 4%) pendant 15 minutes à température de paillasse (TP). Les lames sont ensuite rincées deux fois au PBS 1X puis incubées 1 heure dans une solution de blocage (PBS 1X tween 0,1%, BSA 3%). L'anticorps primaire, dilué dans la solution de blocage, est ensuite placé sur les coupes de muscles pendant 1 heure à TP ou sur la nuit (O/N) à 4°C. Les lames sont ensuite rincées 3 fois 5 minutes avec du PBS-tween 0,1% (PBS-T). L'anticorps secondaire est alors mis en contact avec les coupes pendant 1 heure à TP puis également rincé 3 fois 5 minutes au PBS-T. On marque ensuite les noyaux à l'aide d'une solution de Hoechst (0,4µg/µl) pendant 10 minutes. Les lames sont ensuite montées avec un milieu de montage Prolong Gold (Life Technologies).

Les anticorps primaires utilisés sont un anti-Myosine Néo-natale à 1/50^e et un anti-laminine (Dako) à 1/300^e. Les anticorps secondaires utilisés sont un anti-IgG de lapin et un anti-IgG de souris couplés à un alexafluor488 (Life technologies) à une dilution de 1/500^e.

Résultats

Partie 1

*Myoblastes DM1 & sensibilité au
stress oxydatif*

I. Myoblastes DM1 & sensibilité au stress oxydatif

Les résultats obtenus précédemment dans le laboratoire ont montré d'une part, que les myoblastes isolés de patients DM1 atteints de la forme congénitale, avaient une capacité proliférative réduite par rapport à des myoblastes isolés d'individus non-atteints du même âge, et d'autre part que l'expression prématurée du facteur p16 était responsable de l'arrêt prolifératif précoce des myoblastes DM1 congénitaux ayant de grandes répétitions CTG (Bigot, Klein et al. 2009). En effet, l'inhibition de l'activité de p16 suite à la surexpression de son ligand naturel CdK4 dans les myoblastes DM1, permet d'augmenter leur capacité proliférative à un niveau équivalent à celui des cellules contrôles.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes impliqués dans l'activation précoce de la voie p16 dans les myoblastes DM1. Cette voie étant connue pour être activée lors de stress, nous avons cherché à déterminer si le niveau de stress ou la sensibilité au stress était différent entre des cellules contrôles et DM1. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la composante oxydative du stress. En effet, dans des conditions de cultures dites classiques, les cellules sont soumises à une atmosphère contenant 19% d'oxygène, soit un taux bien plus élevé que celui retrouvé au sein d'un tissu comme le muscle (~3%). Ainsi, nous avons évalué l'impact de la composante oxydative de l'environnement sur le comportement des myoblastes en cultivant les cellules soit à 19% d'oxygène, soit à 5% d'oxygène.

I.1. La capacité proliférative des cellules DM1 est modulée en fonction de l'environnement oxydatif.

La capacité proliférative des myoblastes DM1 possédant de grandes expansions CTG, est réduite par rapport à celle observée dans les cellules contrôles. De plus, il a été montré que les cellules exprimant la mutation DM1 étaient plus sensibles au stress oxydatif (Usuki and Ishiura 1998; Usuki, Takahashi et al. 2000). Nous avons cherché à vérifier si des conditions de culture plus ou moins oxydantes, pouvaient modifier la capacité proliférative des myoblastes DM1. Ainsi des myoblastes contrôles et DM1 contenant plus de 2000 CTG, ont été cultivés dans différentes conditions: soit à 19% d'oxygène (conditions de culture dites

classiques), soit à 3% d'oxygène (conditions physiologiques et moins oxydantes que les conditions classiques).

A 19% d'oxygène, les myoblastes contrôles sont capables de réaliser 52 divisions avant de rentrer en sénescence et de stopper leur prolifération. Comme observé dans des études précédentes, les cellules DM1 voient leur capacité proliférative fortement réduite puisqu'elles ne sont en mesure que d'effectuer 23 divisions. Les résultats obtenus dans la *figure 1* montrent que dans les conditions de culture à 3% d'oxygène, la capacité proliférative des myoblastes DM1 est augmentée de 29% en comparaison des mêmes cellules cultivées dans des conditions classiques. Parallèlement, la capacité proliférative des cellules contrôles n'augmente que de 9%.

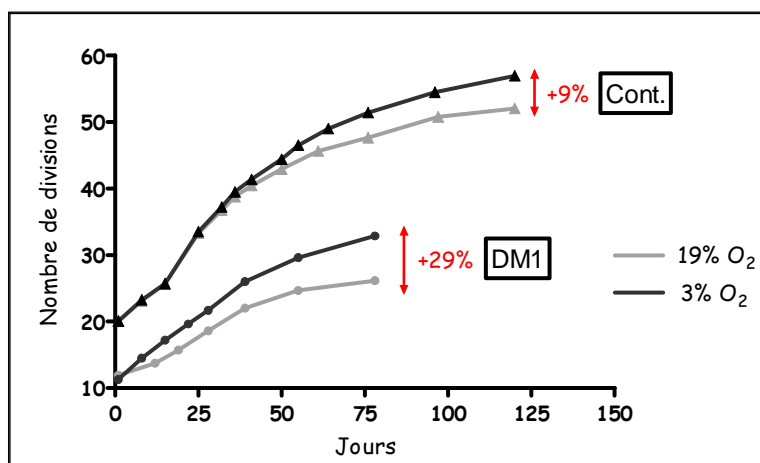


Figure 1 : Capacité proliférative en fonction des conditions de culture

Les cellules contrôles (cont.) placées à 3% d'O₂ présentent une augmentation de leur capacité proliférative de 9% alors que les cellules DM1 voient leur capacité progresser de 29% dans des conditions similaires.

La réduction de la pression partielle d'oxygène dans le milieu de culture, modifie de manière plus significative la capacité proliférative des myoblastes DM1 que celle des cellules contrôles (29% vs. 9% respectivement). Ce résultat suggère que les cellules DM1 ont une sensibilité accrue par rapport aux cellules contrôles face aux conditions oxydantes de l'environnement. Cependant, on constate que ces conditions moins oxydantes ne permettent pas aux myoblastes DM1 de récupérer une capacité proliférative équivalente à celle observée dans les cellules contrôles.

I.2. Les cellules DM1 ont un niveau basal de ROS anormal

Deux études ont montrées une corrélation entre l'expression de répétitions CTG, leur taille et la sensibilité des cellules face au stress oxydatif (Usuki and Ishiura 1998; Usuki, Takahashi et al. 2000). Nos résultats indiquent que la capacité proliférative des myoblastes DM1 ayant une grande expansion CTG, est augmentée lorsque les cellules sont cultivées à un taux faible d'oxygène. Afin de déterminer si la présence des répétitions pathologiques (> 2000 CTG) peut altérer le statut redox des cellules DM1, le niveau de ROS intracellulaires a été mesuré dans ces cellules ainsi que dans les cellules contrôles. La production basale de ROS intracellulaires a été mesurée en « time-lapse » grâce à une technique de fluorescence au DCF (dichlorofluoresceine).

L'analyse de la variation d'intensité de fluorescence dans les cellules DM1 et contrôles montre que le niveau basal de production ROS est significativement plus élevé dans les cellules DM1 que dans les cellules contrôles, avec une augmentation de 57% (*figure 2a*). Afin de vérifier si cette altération était spécifiquement retrouvée dans les myoblastes DM1 ayant de larges expansions CTG, le même type d'expérience a été renouvelé dans deux autres lignées de myoblastes DM1 ayant plus de 2000 triplets CTG ainsi que deux autres cultures de myoblastes contrôles. L'analyse des trois lignées de myoblastes DM1 montre une augmentation significative de la production basale de ROS intracellulaires par rapport aux trois populations contrôles (*figure 2b*). Ces expériences permettent de conclure que les cellules DM1 ayant de grandes répétitions CTG sont caractérisées par une augmentation significative de leur niveau de production de ROS à l'état basal.

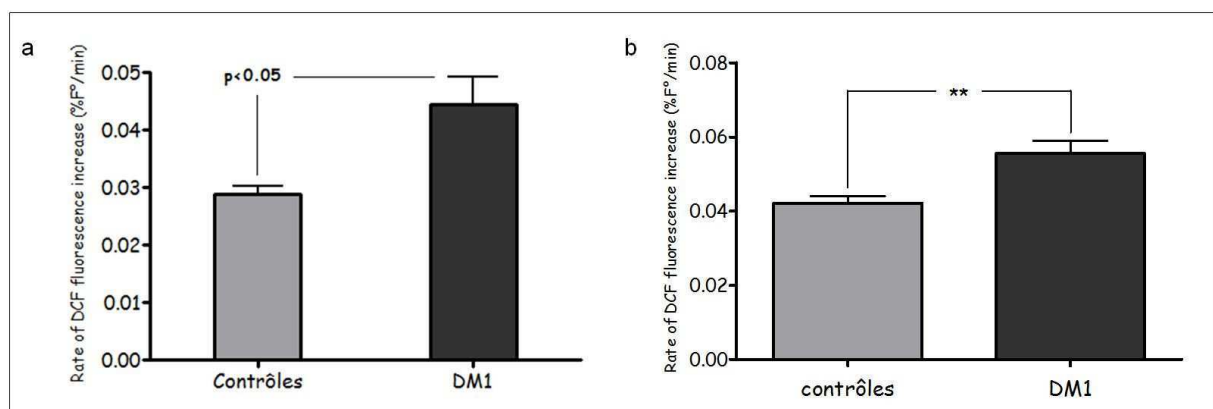


Figure 2 : Comparaison de la production basale et induite de ROS dans les myoblastes contrôles et DM1.

(a) Comparaison de la production de ROS d'une population contrôlé avec une population DM1. (b) Résultats globaux obtenus grâce à la comparaison de 3 populations de chaque type. Le niveau de production de ROS apparaît plus élevé dans les cellules DM1.

Ces observations indiquent une relation entre la mutation DM1, un niveau accru de ROS intracellulaires et une sensibilité particulière des myoblastes DM1 face au stress oxydatif. Les ROS étant connus pour participer à l'activation de différentes voies de signalisation, nous nous sommes intéressés au rôle du statut redox dans l'activation de p16 et l'arrêt prolifératif précoce des cellules DM1.

I.3. Activation précoce de la voie p16 et environnement oxydatif

Dans un travail précédent, nous avons montré que l'arrêt prolifératif précoce des cellules DM1 était dû à l'activation prématurée de p16. L'activation de la voie p16 pouvant être induite par différents stress, et notamment en cas de stress oxydatif, nous avons examiné le lien entre le niveau oxydatif de nos conditions de culture et l'activation de la voie p16. Pour cela, nous avons déterminé les niveaux d'ARNm p16^{INK4A} par RT-PCR au cours de la vie répllicative des myoblastes contrôles et DM1 cultivées à 19% et 3% d'oxygène (*Figure 3*).

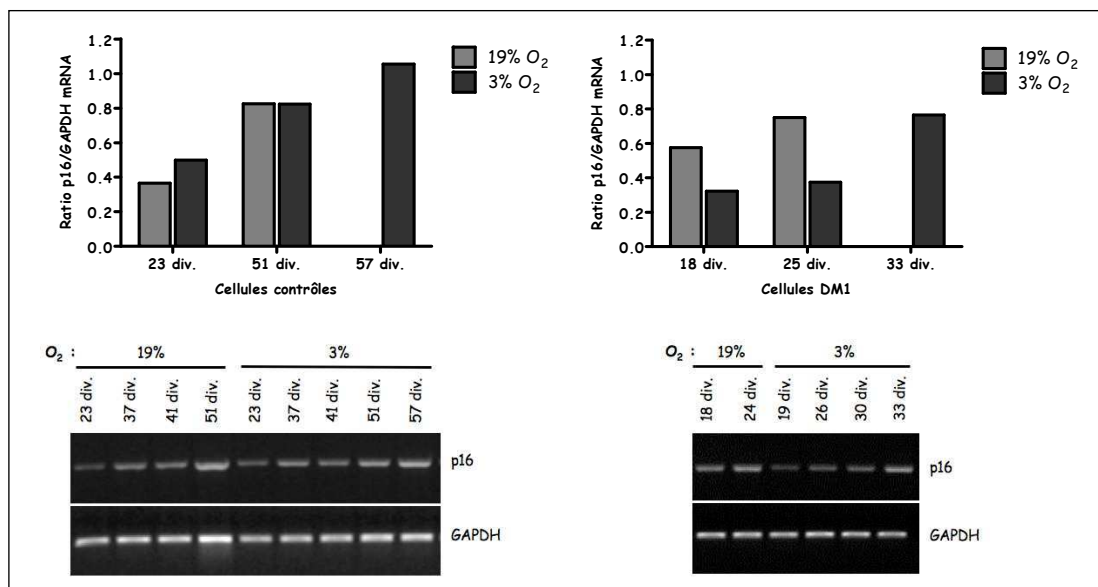


Figure 3 : Quantification des taux d'ARNm p16^{INK4A} par RT-PCR

Les cellules DM1 cultivées à 3% d'O₂ présentent une diminution du niveau d'ARNm p16 contrairement aux cellules contrôles pour lesquelles le niveau de p16 ne varie pas en fonction de la PO₂.

La quantification des signaux obtenus sur gel d'agarose montre que les niveaux d'ARNm p16 augmentaient au cours de la vie proliférative des cellules DM1 et contrôles. Nous pouvons constater d'une part qu'à 19% d'O₂, les niveaux d'ARN p16 sont déjà plus élevés dans les cellules DM1 à 18 divisions que dans les cellules contrôles à 23 divisions, et d'autre part, que les niveaux d'ARNm p16 mesurés dans les cellules contrôles, varient peu en fonction du taux d'oxygène auquel les cellules sont soumises. A l'inverse, on observe une diminution d'environ 50% du taux d'ARNm p16 dans les cellules DM1 cultivées à 3% d'O₂ comparativement à celles poussant à 19%. De plus, l'augmentation de l'expression de p16 dans les cellules DM1 cultivées à 3% d'O₂ apparaît plus tardivement au cours de leur vie proliférative mais, en sénescence, ces cellules possèdent un niveau de p16 équivalent à celui observé dans les cellules sénescents poussant à une PO₂ atmosphérique.

L'augmentation tardive de p16 dans les cellules DM1 cultivées à 3% coïncide avec l'augmentation de la capacité proliférative de ces cellules. Dans le cas des cellules contrôles, les conditions de culture à 3% d'oxygène semblent avoir peu d'impact sur l'expression de p16 et ne conduisent qu'à une faible augmentation de la capacité proliférative des cellules. L'ensemble de ces observations suggère une corrélation entre la présence de la mutation (CTG)_{exp}, le stress oxydatif et l'activation précoce de p16 qui conduit à l'arrêt prématuré des myoblastes DM1. La suite de cette étude va donc consister à déterminer la nature de ce lien. Nous nous sommes tout d'abord intéressé à évaluer l'effet de l'augmentation basale de ROS sur deux régulateurs de p16, AUF1 et miR-24.

1.4. AUF1 : un facteur de régulation de p16 ?

Il a été montré que les protéines de la famille AUF1 (AU-rich factor ou hnRNP-D) étaient capables de réguler l'expression protéique de p16 (Wang, Martindale et al. 2005). En effet, les membres de cette famille de RNA binding Protein sont capables de se fixer à des régions riches en séquences répétées AU (Gratacos and Brewer 2010). Or, ce type de séquence est retrouvé dans la région 3' non transcrite de l'ARN p16. Cette fixation a pour conséquence une dégradation de l'ARN et donc, une diminution de la quantité de protéines p16 synthétisées. La famille des protéines AUF1 est représentée par quatre isoformes : p37, p40, p42 et p45. L'isoforme p37 est apparue comme particulièrement importante dans la régulation de p16 (Sarkar, Xi et al. 2003). En sénescence, la quantité de protéines AUF1

diminue, ce qui conduit à une stabilisation des ARNm p16 et une augmentation du niveau protéique de p16. Nous avons donc envisagé l'hypothèse d'une modification de l'homéostasie des isoformes AUF1 dans les cellules DM1 suite à une dérégulation du mécanisme d'épissage alternatif, pouvant conduire à une régulation anormale de p16. Nous avons vérifié par western blot les niveaux d'expression des isoformes d'AUF1 dans les cellules DM1 et contrôles en début et fin de vie proliférative (*figure 4*).

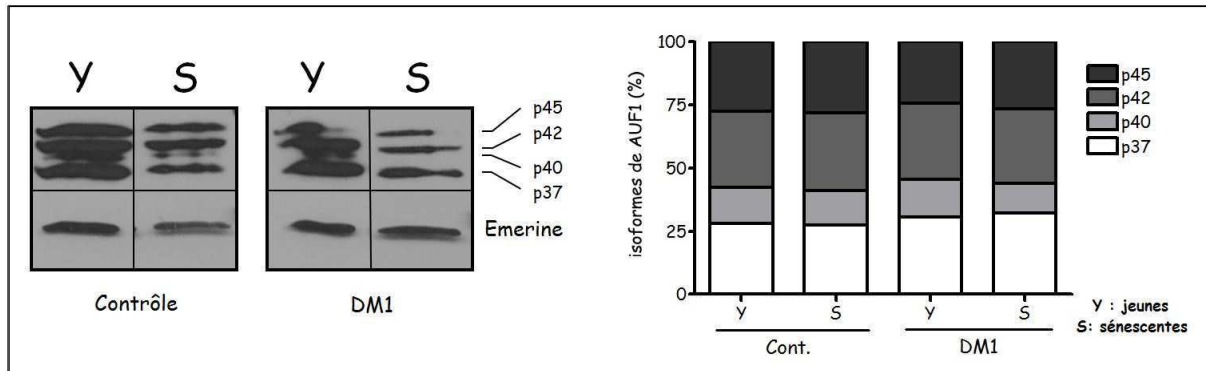


Figure 4 : Western blot AUF1 sur des cellules contrôles et DM1 jeunes et sénescents

Les deux types de cellules présentent le même profil avec une diminution globale des différentes isoformes d'AUF1 entre les cellules jeunes (Y) et sénescents (S)

La comparaison des profils d'expression des isoformes d'AUF1 n'a pas mis en évidence de modifications significatives entre les cellules contrôles et DM1. Dans ces deux types de cellules, nous avons constaté une diminution globale des différentes isoformes au cours de la vie proliférative. L'isoforme p37 caractérisée comme ayant l'affinité la plus importante pour l'ARN p16, possède un niveau équivalent dans les cellules contrôles et DM1. Ces observations ne semblent donc pas accréditer l'hypothèse d'une dérégulation d'AUF1 dans les myoblastes DM1 pouvant induire une expression précoce des protéines p16.

1.5. Une régulation de la traduction de p16 par miR-24 ?

Dans le cadre d'une perturbation des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de p16 dans les myoblastes DM1, nous nous sommes également intéressés à une régulation de la traduction de l'ARN p16^{INK4A} par le microRNA miR-24. En effet, il a été montré que miR-24 était capable de se fixer sur les ARNm de p16 et d'inhiber le processus d'initiation et d'élongation de la traduction (Lal, Kim et al. 2008). L'élévation du niveau de protéines

p16^{INK4A} a été associée à la réduction de miR-24 dans les fibroblastes humains. Deux études récentes ayant montré une altération de certains miRNAs dans les tissus de patients DM1 (Perbellini, Greco et al. 2011; Rau, Freyermuth et al. 2011), il nous a paru intéressant de vérifier si miR-24 était également perturbé dans les myoblastes DM1. L'expression de miR-24 a été mesurée par qPCR (en collaboration avec Frédérique Rau et Nicolas Charlet, IGBMC, Strasbourg) au cours de la vie proliférative des cellules contrôles et DM1 cultivées à 19 % et 3% d'oxygène.

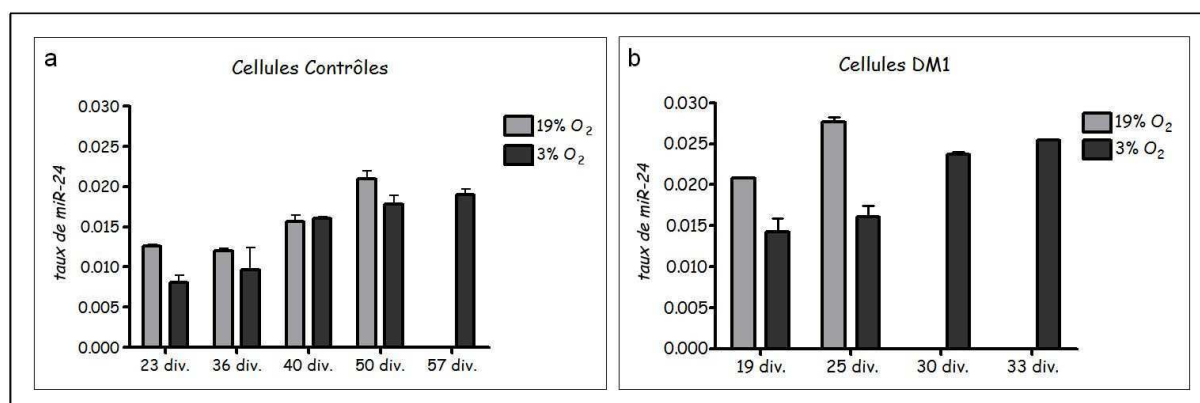


Figure 5 : Quantification par qPCR de miR-24 au cours de la prolifération des cellules

La quantité de miR-24 augmente dans les cellules au cours de leur vie proliférative. Les cellules DM1 présentent un niveau plus élevé que les cellules contrôles. Le stress oxydatif subi par les cellules DM1 semble influencer la production de miR-24 (b) contrairement à son effet sur les cellules contrôles (a). Normalisation par snRNA U6.

La *figure 5* montre que, contrairement aux résultats de Lal (Lal, Kim et al. 2008) obtenus sur des cultures de fibroblastes humains, le taux de miR-24 dans les myoblastes contrôles et DM1 augmente au cours de la vie proliférative. De plus, il y a une différence d'expression de miR-24 entre les cellules contrôles et DM1, ces dernières présentant un niveau plus important quel que soit les conditions de culture. L'augmentation de miR-24 ne paraît pas compatible avec une augmentation de la quantité de protéines p16 et il paraît difficile de proposer que miR-24 soit un facteur majeur de régulation de p16 dans les myoblastes humains. On peut toutefois noter un niveau plus élevé de miR-24 dans les cellules DM1 cultivées à 19% d'oxygène que dans celles placées à 3% d'O₂ mais cette différence d'expression de miR-24 n'est pas retrouvée dans les cellules contrôles. Bien que l'expression de miR-24 paraisse être régulée de façon différentielle dans les myoblastes contrôles et DM1 en fonction du statut redox, ces résultats ne confortent pas l'hypothèse d'une régulation du niveau protéique de p16 par miR-24 dans notre modèle cellulaire.

I.6. Lien entre stress oxydatif et activation de p16.

La réduction du stress oxydatif dans les cultures à 3% d'O₂, a permis de mettre en évidence des corrélations entre les niveaux de ROS, l'activation de p16 et la sénescence précoce des myoblastes DM1. Cependant, ce système demeure perfectible à certains égards. Ainsi, on induit des stress oxydatifs répétés à chaque sortie des cellules de l'incubateur à 3% O₂ lors des passages, des observations et des traitements. Afin de continuer notre étude, nous avons utilisé l'approche opposée qui consiste à soumettre les cellules cultivées dans des conditions classiques à un stress induit via l'addition de substances réactives, notamment le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce type d'approche nous permet également de nous affranchir d'un certain nombre de difficultés techniques, tout en nous permettant de comparer les effets d'un stress oxydatif sur des cellules DM1 et contrôles.

a. Conditions d'induction d'un stress oxydatif par le H₂O₂

Dans un premier temps, nous avons déterminé les doses de peroxyde d'hydrogène sub-toxiques pour les myoblastes humains. Différentes conditions d'induction du stress ont été testées en faisant varier le temps de mise en contact des cellules avec le peroxyde d'hydrogène, la concentration de celui-ci et le temps laissé entre l'induction et la récupération des cellules. Nous avons constaté qu'une exposition trop longue (supérieure à 6 heures) au peroxyde d'hydrogène était toxique pour la cellule. De même, des doses de H₂O₂ supérieures à 200µM ont pour conséquence une mort massive et rapide des myoblastes. Nous sommes ainsi parvenus à définir des conditions précises de stress sub-toxique nous permettant un maintien en vie des cellules. Ainsi, afin de confirmer les résultats obtenus précédemment, nous avons soumis des cultures de myoblastes contrôles et DM1 possédant un nombre de divisions équivalent à la moitié de leur capacité proliférative respective, à 100 et 200µM de peroxyde d'hydrogène pendant une heure. Puis, les cellules ont été rincées et incubées dans le milieu de prolifération avant d'être récoltées 48h plus tard.

b. Activation de p16^{INK4A} par un stress oxydatif

Après avoir déterminé des doses de peroxyde d'hydrogène sub-toxiques pour notre modèle cellulaire, nous avons évalué si ce type de stress était capable d'activer p16. Plusieurs études ont déjà montrées que l'addition d'H₂O₂ dans le milieu de culture peut activer la voie p16 par différents mécanismes, l'expression de p16 étant susceptible d'être régulée de façon transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle (Kim and Wong 2009; Guo, Ma et al. 2010; Jenkins, Liu et al. 2011).

En premier lieu, nous avons vérifié, dans des myoblastes contrôles et DM1, l'impact d'un stress induit par le peroxyde d'hydrogène sur l'expression de p16. 48 heures après un traitement au H₂O₂, les cellules ont été récoltées, les ARN extraits et l'expression de p16 a été analysée par RT-PCR semi-quantitative (*Figure 6*). Après normalisation à l'aide du gène B2M, on constate que les niveaux d'ARNm p16 dans les cellules DM1 sont significativement augmentés, de 4 et 6 fois respectivement aux doses de 100 et 200µM d'H₂O₂. A l'inverse, la quantité de p16 n'augmente pas de manière significative dans les cellules contrôles. Ce résultat montre que l'expression de p16 peut être activée par un stress oxydatif induit par le H₂O₂ dans le myoblastes DM1. De plus, ceci confirme également la différence de sensibilité des cellules DM1 face au stress oxydatif mise en évidence par les expériences de culture des cellules dans des environnements plus ou moins oxydants (I.1 et I.3).

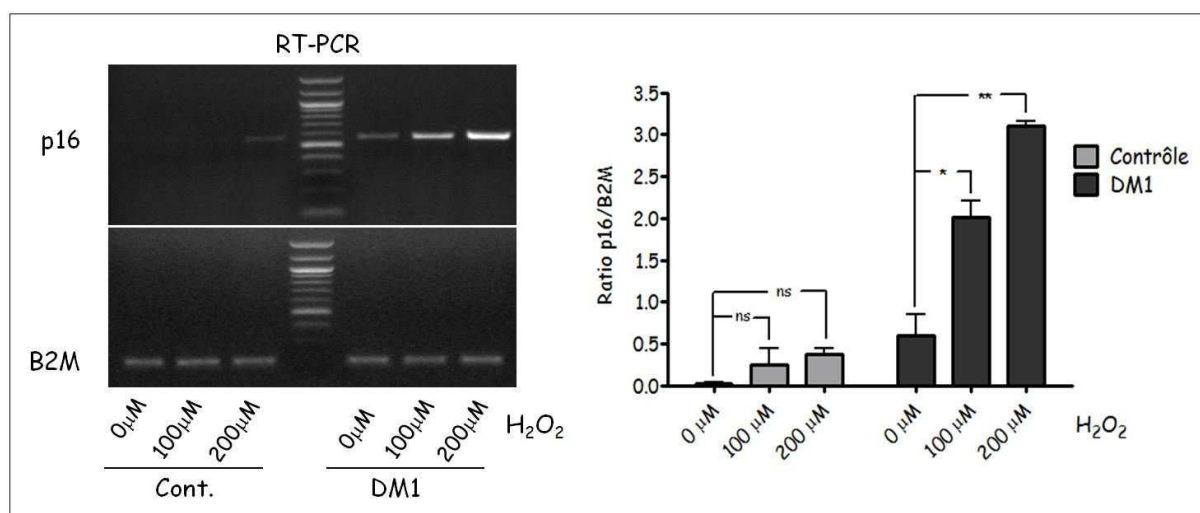


Figure 6 : Quantification des niveaux d'ARNm p16 par RT-PCR dans les cellules contrôles et DM1 traitées au peroxyde d'hydrogène.

L'induction d'un stress oxydatif augmente significativement l'expression de p16 dans les cellules DM1, celle-ci n'augmentant pas de façon significative dans les cellules contrôles.

Suite à ces résultats, nous avons vérifié par western blot que l'augmentation de l'expression des ARNm de p16 conduisait bien à une augmentation de la protéine p16 (figure 7). Le niveau de la protéine p16, suite à l'induction du stress oxydatif par le peroxyde d'hydrogène, a été mesuré dans des extraits protéiques réalisés sur des échantillons de cellules traitées parallèlement à celles utilisées pour les extractions d'ARN. Nous avons observé qu'à 100 μ M, le niveau de la protéine p16 augmentait de 80% dans les myoblastes DM1, ce qui corrèle avec l'augmentation observée en ARNm. En revanche, une augmentation plus faible (40%) est également observée dans les cellules contrôles, alors que seule une augmentation non significative avait été mesurée en RT-PCR. De façon étonnante, le niveau de protéines p16 augmente de manière similaire dans les cellules contrôles et DM1 après un traitement à 200 μ M. Il semblerait que la dose de 200 μ M d'H₂O₂, bien que sub-toxique au niveau cellulaire, soit trop élevée et altère de manière non-spécifique ou à un niveau post-transcriptionnel l'expression des protéines p16. Cependant, la grande variabilité observée entre les différents western blots, empêche toute conclusion définitive des résultats obtenus.

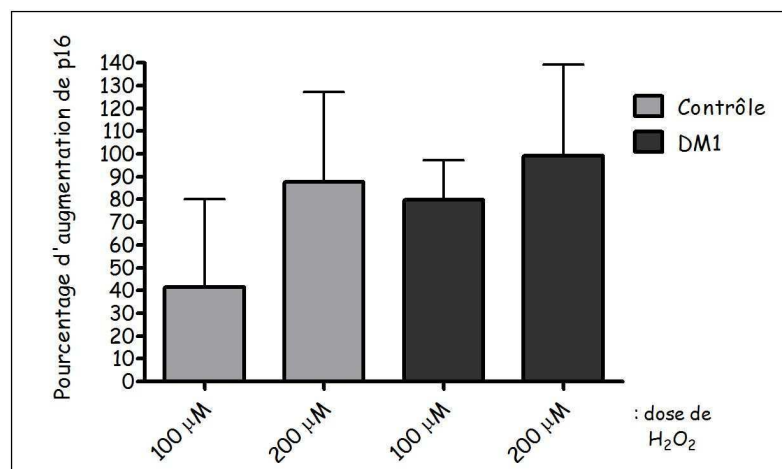


Figure 7 : Pourcentage d'augmentation des niveaux de protéines p16^{INK4A} par western blot dans les cellules contrôles et DM1 traitées au peroxyde d'hydrogène.

L'expression de la protéine p16 augmente dans les deux types cellulaires lors d'un stress oxydatif.

I.7. Régulation post-transcriptionnelle de $p16^{INK4A}$ suite à un stress oxydant

Comme expliqué précédemment (I.5), les facteurs de la famille AUF1 sont connus pour intervenir dans la régulation de l'expression de la protéine p16 (Wang, Martindale et al. 2005). De plus, une étude récente a également mis en évidence l'implication d'AUF1 dans l'activation de p16 lors d'un stress provoqué par le peroxyde d'hydrogène (Guo, Ma et al. 2010). Nous avons donc évalué si ce facteur pouvait être dérégulé dans les myoblastes DM1 lors d'un traitement au peroxyde d'hydrogène. Une modification du niveau d'expression des protéines AUF1 ou du ratio des différentes isoformes dans les cellules DM1 par rapport aux cellules contrôles, pourrait conduire à une modification la stabilité de l'ARNm p16, expliquant ainsi les différences observées entre ces deux types de cellules suite à un stress oxydant.

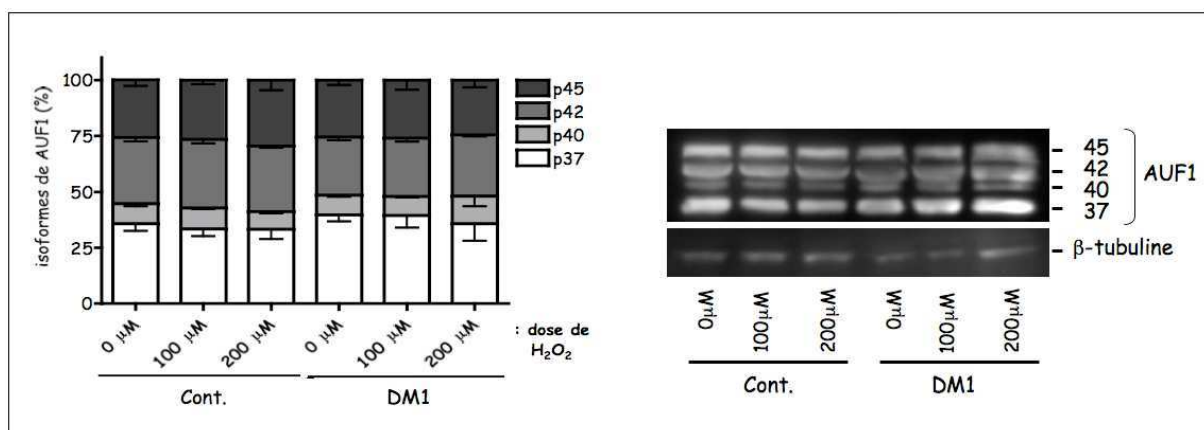


Figure 8 : Répartition des différentes isoformes d'AUF1 après un traitement au H₂O₂

Quantification des différentes isoformes d'AUF1 réalisée après intégration des signaux obtenus par western blot et normalisés par rapport à la β-tubuline.

L'analyse d'AUF1 par western blot (*figure 8*) montre que, contrairement aux observations effectuées par l'équipe de Guo, le traitement au peroxyde d'hydrogène ne modifie pas l'expression des différentes isoformes d'AUF1 dans les cellules DM1 et contrôles. De même, nous n'avons pas constaté de variation importante de la quantité globale de protéines AUF1 entre les cellules contrôles et DM1.

I.8. Régulation transcriptionnelle de la voie p16^{INK4A}

L'hypothèse d'une régulation post-transcriptionnelle de p16 via des facteurs tels que miR-24 ou AUF1 n'ayant été poursuivie, nous avons cherché à déterminer quelles voies de signalisation pouvaient être impliquées dans l'activation précoce de p16 dans les myoblastes DM1. A l'aide de notre modèle d'induction de stress par H₂O₂, nous avons examiné plusieurs voies de signalisation connues pour réguler p16. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux MAPKinases incluant des acteurs moléculaires tels que PKC, Raf/Ras, Mek ½, Erk ½, car l'activation de cette voie va conduire à l'inhibition d'un régulateur négatif de la transcription de p16 : Bmi-1. La voie p38 a également été étudiée, celle-ci étant également connue pour activer la voie p16 (voir Introduction : I.3.b Mécanismes d'activation de la voie p16, figure 14).

a. Protéine Kinase C

L'activation de la transcription de p16^{INK4A} suite à un stress de type oxydatif, peut faire intervenir différentes MAPKinases. Il est possible d'analyser l'activité des différents acteurs de cette voie par western blot à l'aide d'anticorps spécifiques car les MAPKinases sont phosphorylées sous leur forme active. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la protéine Kinase C (PKC). En plus de pouvoir jouer un rôle dans l'expression de p16 sous certaines conditions, certains membres de la famille des PKC ont été décrits comme étant anormalement régulés dans les tissus de patients DM1. Récemment, l'équipe de Cooper a proposé qu'une activation anormale de la PKC fût responsable de l'hyper-phosphorylation de CUGBP1. Il a aussi démontré que l'inhibition de la PKC améliorerait le phénotype cardiaque observé dans un modèle de souris DM1 (Kuyumcu-Martinez, Wang et al. 2007; Wang, Kuyumcu-Martinez et al. 2009). En se basant sur ces résultats, nous avons émis l'hypothèse qu'une sur-activation de PKC pourrait avoir comme répercussions une régulation anormale de la cascade de signalisation et une activation de l'expression de p16. Le niveau d'activation de PKC a été mesuré par western blot dans des cellules contrôles et DM1 traitées ou non au peroxyde d'hydrogène (*figure 9*).

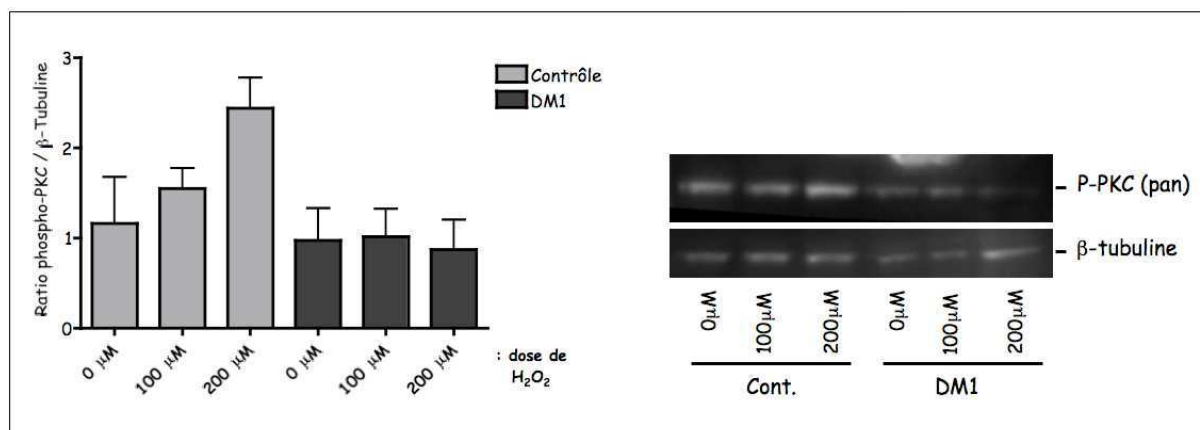


Figure 9 : Quantification du niveau de protéines PKC phosphorylées

Les western blots réalisés à partir des cellules contrôles et DM1 traitées au H₂O₂, ne révèlent pas d'activation anormale dans les cellules DM1.

On constate une augmentation de la quantité de protéines PKC phosphorylées dans les cellules contrôles traitées avec 200μM d'H₂O₂. De façon étonnante, aucune augmentation de la quantité de PKC activées n'a été observée dans les myoblastes DM1 non traités par rapport aux cellules contrôles, ou traités au peroxyde d'hydrogène. Ce résultat indique que l'activation de la voie p16 pourrait se faire soit via un autre acteur de cette voie moléculaire, soit via une voie indépendante.

b. L'implication de Erk 1/2

Notre modèle de myoblastes DM1 n'ayant pas révélé d'hyper-phosphorylation de PKC, que ce soit à l'état basal ou après un traitement au H₂O₂, nous avons évalué l'état d'activation des autres acteurs de la voie des MAPK. Ainsi, il a été montré que Erk (Extracellular signal-Regulated Kinase) pouvait être activé par un traitement au peroxyde d'hydrogène (Guyton, Liu et al. 1996; Abe, Kartha et al. 1998) et d'autre part, que son activité participe à la régulation de l'expression de p16 (Wen-Sheng 2003). Plus récemment, une étude a mis en évidence, dans des astrocytes, une corrélation entre le stress oxydatif, la cascade de signalisation Erk et l'activation de p16 (Kim and Wong 2009). Nous avons mesuré l'activation des MAPK Erk 1 et 2 par western blot dans les myoblastes contrôles et DM1 lors d'un traitement au peroxyde d'hydrogène (*figure 10*).

On constate tout d'abord que sans traitement, le niveau basal de phosphorylation de Erk 1 et 2 est plus élevé dans les myoblastes DM1 que dans les cellules contrôles. Après un

traitement à 100 μ M, l'activité Erk 1 et 2 est augmentée dans le myoblastes DM1 alors qu'elle ne varie pas dans les cellules contrôles. Ainsi, le taux de Erk1 observé dans les cellules DM1 est jusqu'à 5 fois supérieur à celui retrouvé dans les cellules contrôles traitées de la même manière. Cette augmentation de phosphorylation de Erk 1 et 2, est toujours nettement visible dans les myoblastes DM1 à 200 μ M et une faible augmentation de ces deux protéines est observée dans les cellules contrôles à cette dose. Contrairement aux résultats obtenus concernant les PKC, les MAPKinases Erk 1 et 2 apparaissent comme pouvant jouer un rôle dans la signalisation résultante d'un stress oxydatif. Erk 1/2 apparait comme un candidat intéressant et pourrait être impliqué dans les mécanismes d'activation précoce de p16 au cours de la sénescence des myoblastes DM1.

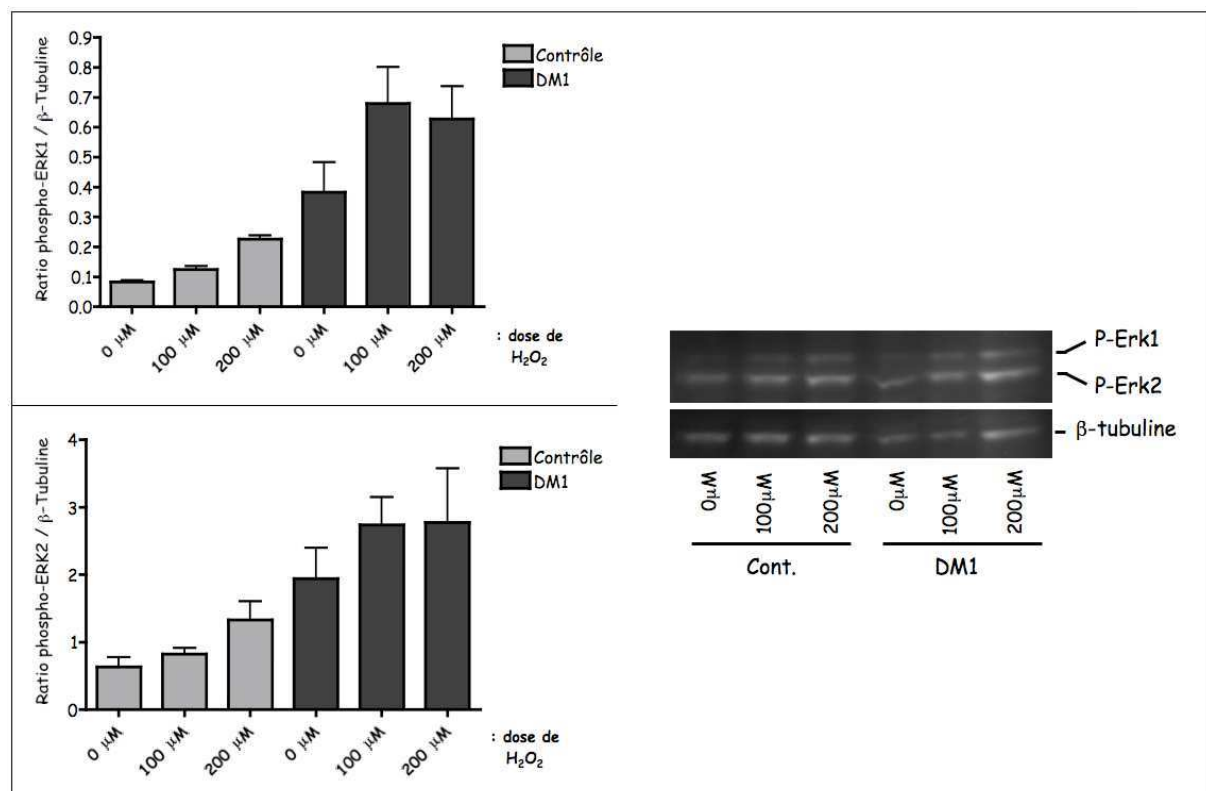


Figure 10 : Quantification du niveau de protéines Erk1 et Erk2 phosphorylées

Les myoblastes DM1 présentent un niveau basal de protéines Erk activées plus élevé que les cellules contrôles. 48 heures après traitement, les cellules DM1 soumises à un stress oxydatif sont caractérisées par une forte augmentation de la proportion de protéines Erk 1 et 2 phosphorylées et donc activées.

c. p38

Suite aux résultats précédents montrant une activation des MAPKinases Erk 1/2 lors d'un stress oxydant, nous avons examiné l'activité de p38, facteur également connu pour être impliqué dans la transduction d'un signal lors d'un stress oxydatif (Dasari, Bartholomew et al. 2006). En 2003, l'équipe d'Ishikawa avait montré un rôle de la voie p38 dans les phénomènes de sénescence provoqués par l'addition d'une dose sub-léthale de peroxyde d'hydrogène dans des fibroblastes pulmonaires fœtaux (WI-38) (Iwasa, Han et al. 2003). En 2010, une autre étude a proposé p38 comme un modulateur de l'expression de p16 et de l'induction de la sénescence suite à une exposition à la doxorubicine dans des cellules endothéliales progénitrices (Spallarossa, Altieri et al. 2010). Nous avons examiné le taux de protéines p38 phosphorylées par western blot dans des cellules contrôles et DM1 soumises ou non, à un stress oxydatif.

La *figure 11* montre que l'addition de 200 μ M de peroxyde d'hydrogène dans le milieu de culture, entraîne une augmentation du taux de protéines p38 actives (phosphorylées) dans les myoblastes contrôle et DM1. Contrairement aux résultats obtenus pour les protéines Erk1/2, nous n'avons pas constaté de différences significatives entre les cellules contrôles et DM1.

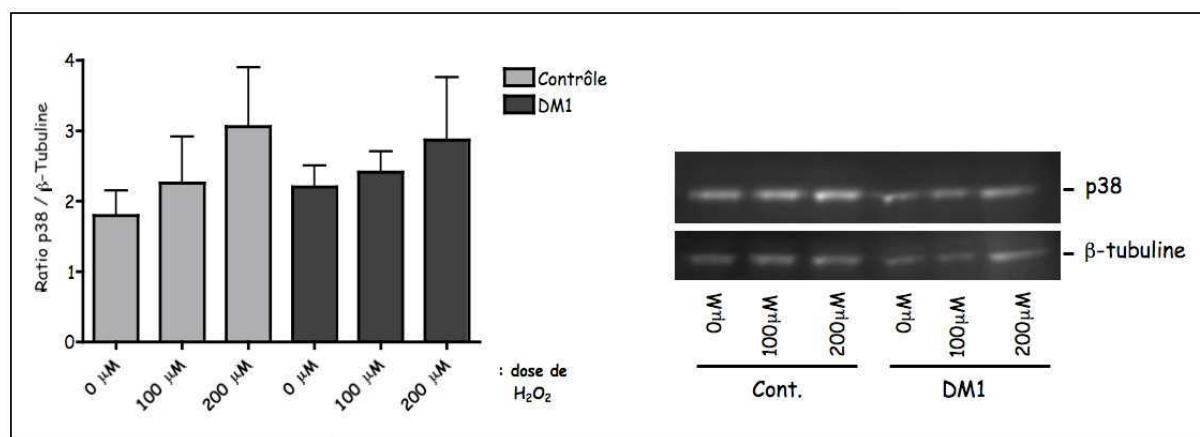


Figure 11 : Quantification par western blot de l'activité de p38

Augmentation de taux de p38 phosphorylées à 200 μ M dans les cellules contrôle et les DM1.

Malgré l'activation de la voie p38 lors d'un stress oxydatif, l'absence de différences significatives entre les cellules contrôles et DM1 exclue l'intervention de cette voie dans la perturbation de l'activité de p16.

Partie II

Développement d'un modèle DM1

inductible

II. Développement d'un modèle DM1 inductible

Les myoblastes isolés de patients DM1 ayant la forme congénitale associée à de larges expansions CTG, sont caractérisées par une capacité proliférative réduite, ainsi que par une altération de leur capacité de différenciation et de fusion. En plus de la rareté de ce matériel et des contraintes de manipulation de ces cultures primaires (comme leur faible capacité proliférative et leur faible myogénicité), il nous est apparu important de développer un modèle nous permettant d'étudier les mécanismes moléculaires précocement altérés par la mutation DM1. Nous avons donc développé un modèle cellulaire de myoblastes humains capables d'exprimer des ARNs pathologiques contenant un grand nombre de répétitions CTG, sous le contrôle d'un promoteur inductible. De plus, ce type de modèle permettrait d'établir un lien direct entre l'expression des expansions CTG et les différents événements observés dans les cellules issues des patients.

II.1. *Caractérisation du modèle cellulaire DM1 inductible*

a. Construction de l'outil

L'étude d'un modèle cellulaire capable d'exprimer des ARNm contenant de grandes expansions CUG, a débuté par la construction d'un plasmide nous permettant, *in fine*, d'obtenir un outil stable et inductible. Nous avons basé notre outil sur un plasmide permettant la production de lentivirus. Le vecteur lentiviral possède comme avantage de conduire à l'intégration de notre transgène et de son promoteur au sein du génome de la cellule et ainsi d'en assurer une expression stable au cours des divisions.

Le plasmide receveur utilisé possède un système d'expression inductible « tout-en-un ». Les limites de ce type de construction viennent généralement d'une transcription du transgène soit trop peu efficace après induction, soit trop active sans induction, ce qui a pour conséquence, une production basale du transgène trop élevée. Pour notre étude nous avons eu accès à un plasmide lentiviral inductible développé par l'équipe d'Olivier Danos. Cette construction a été caractérisée dans une étude qui a permis de déterminer l'efficacité de différents plasmides ainsi que les niveaux de transgènes produits en absence ou en présence d'induction, en fonction des différents éléments régulateurs greffés sur les constructions

II. Développement d'un modèle DM1 inducible

(figure 12) (Barde, Zanta-Boussif et al. 2006). Nous avons utilisé le plasmide TMPrtTA pour sa capacité à produire de façon efficace le transgène incorporé après induction par la doxycycline (Dox), mais également car il est capable de limiter au maximum cette synthèse en absence d'induction. Constitué des différents éléments nécessaires à la formation de particules virales, ce plasmide possède également des éléments spécifiques comme un promoteur phospho-glycérate kinase hPGK, un promoteur CMV minimal régulé par la tétracycline ainsi que le trans-activateur dépendant de la tétracycline rtTA2s-M2. La combinaison de ces différents éléments permet une expression contrôlée du transgène en réponse à un apport de doxycycline au milieu de culture.

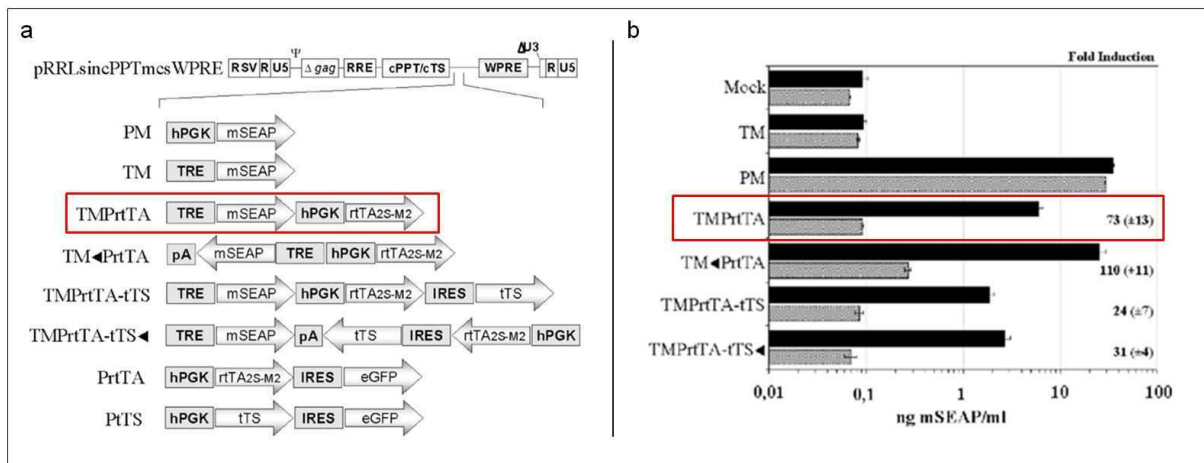


Figure 12 : Schéma représentatif du plasmide receveur et de son efficacité

(a) Différents vecteurs lentiviraux possédant chacun une combinaison différente d'éléments régulateurs, ont été testés. (b) Les résultats de ces tests sont représentés sous forme de diagramme : les barres grises correspondent à la production de transgène en absence d'induction. Les barres noires représentent le taux de transgène produit en présence d'inducteur. Les encadrements rouges correspondent à la construction retenue pour notre étude (Barde, Zanta-Boussif et al. 2006).

L'autre élément de notre construction est une séquence de répétitions CTG. Celle-ci a été obtenue de Tom Cooper qui a développé un plasmide DT960 qui contenant la partie 3' non transcrite du gène de la DMPK avec 960 répétitions CTG. Ces dernières sont séparées toutes les 20 répétitions par une séquence CTCGA. L'incorporation de cette séquence dans le vecteur lentiviral inducible devrait donc permettre de réguler de façon précise l'expression des expansions CTG et ainsi d'évaluer directement les conséquences de la formation des foci dans les myoblastes.

b. Tests préliminaires

Après avoir réalisé la construction du plasmide, nous avons vérifié sa fonctionnalité en réalisant une transfection transitoire dans des cellules HEK 293T. En plus de notre construction inducible, un plasmide exprimant de façon constitutive la GFP fut également transfecté dans ce même type de cellules afin de vérifier le taux de transfection. L'expression de l'ARN-CUG a été induite par addition de doxycycline pendant 24 heures. Une autre fraction de cellules n'a pas reçu la doxycycline afin de mesurer le niveau de fuites de notre construction. Les cellules ont ensuite été fixées, puis la présence ou non de foci au sein des noyaux, a été vérifiée par FISH (*figure 13*).

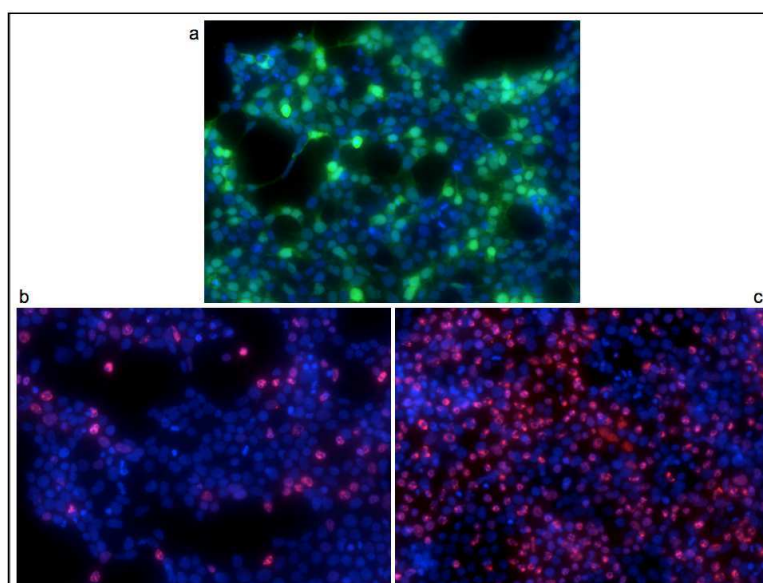


Figure 13 : Test de fonctionnalité du plasmide 960CTG inducible

Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec un plasmide contrôle exprimant la GFP afin de vérifier le taux de transfection (a). La présence de foci (Cy3) dans les cellules transfectées par le plasmide 960CTG inducible a été vérifiée par FISH, sans traitement Dox (b) ou après un traitement de 24h de Dox (c). Les noyaux ont été marqués par le Hoechst.

L'utilisation du plasmide GFP nous a permis de montrer que notre méthode de transfection (lipofectamine 2000) est efficace. En effet, les cellules positives pour la GFP représentent environ 70 à 80% des cellules totales (*figure 13a*). Nous avons ensuite analysé par FISH, les cellules transfectées par le vecteur lentiviral contenant les répétitions CTG. En absence d'induction par la doxycycline, seule une faible proportion des cellules contient des foci, ceci confirmant l'efficacité du verrouillage du système d'induction (*figure 13b*). A l'inverse, l'induction par la doxycycline entraîne la production des ARNs contenant les

répétitions CUG et la formation d'agrégats nucléaires dans la majorité des cellules (*figure 13c*).

La transfection transitoire de notre construction dans ces cellules nous a permis de confirmer son efficacité à la fois du point de vue de l'expression du transgène, mais également du point de vue du verrouillage de cette expression en absence d'induction.

c. Caractérisation du modèle inducible.

Après avoir testé la fonctionnalité et l'efficacité de notre construction, nous avons fait produire des vecteurs lentiviraux afin de pouvoir transduire efficacement les myoblastes humains en vue d'obtenir une expression stable du transgène. Nous avons réalisé différents tests de transduction afin de définir les conditions optimales d'infection combinant une bonne efficacité de transduction (70 à 80% de cellules infectées) tout en limitant l'effet cytotoxique de l'infection. Une fois ces dernières établies, des myoblastes contrôles furent transduits à deux reprises afin de maximiser la proportion de cellules ayant intégré la construction. L'expression du transgène ARN-CUG a été vérifiée par FISH afin de montrer la capacité des cellules à former des foci nucléaires.

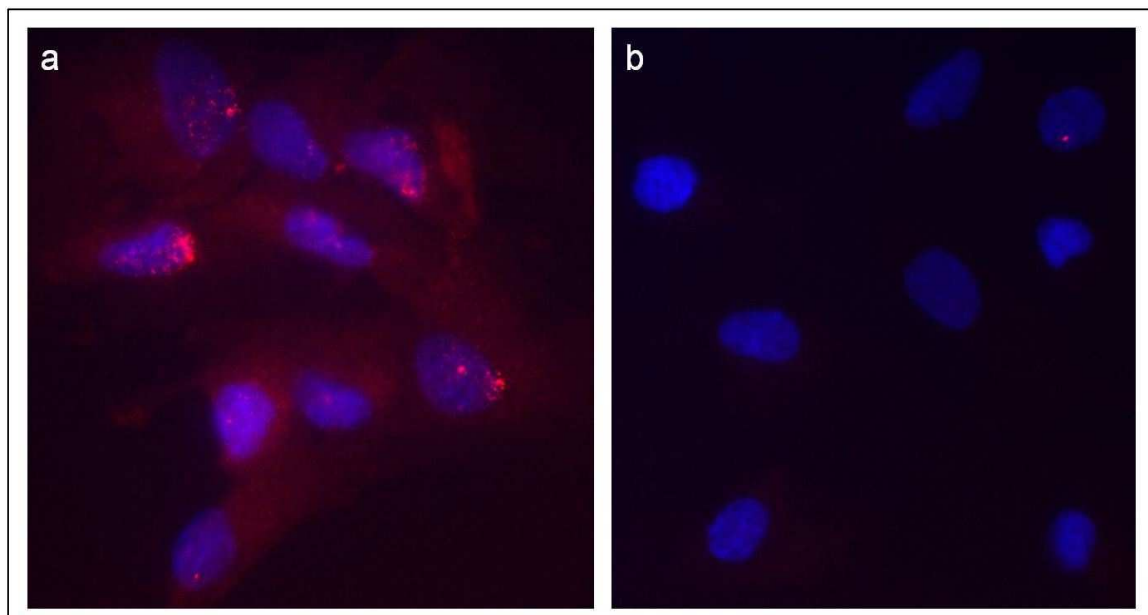


Figure 14 : marquage des foci par FISH dans les myoblastes 960CTG au cours de l'induction à la Doxycycline

(a) après 24h d'induction par la doxycycline, une proportion importante des cellules transduites présentent des foci nucléaires (en rouge). (b) Au bout de 7 jours d'induction, seul un faible nombre de myoblastes possèdent toujours des agrégats d'ARN-CUG.

Nous avons tout d'abord recherché la présence ou non de foci dans les cellules transduites. Quasiment aucun foci n'est détectable dans ces cellules en absence d'induction. Ces mêmes cellules ont également été mises en présence de doxycycline (4 μ g/ml) pendant des temps différents avant d'être fixées.

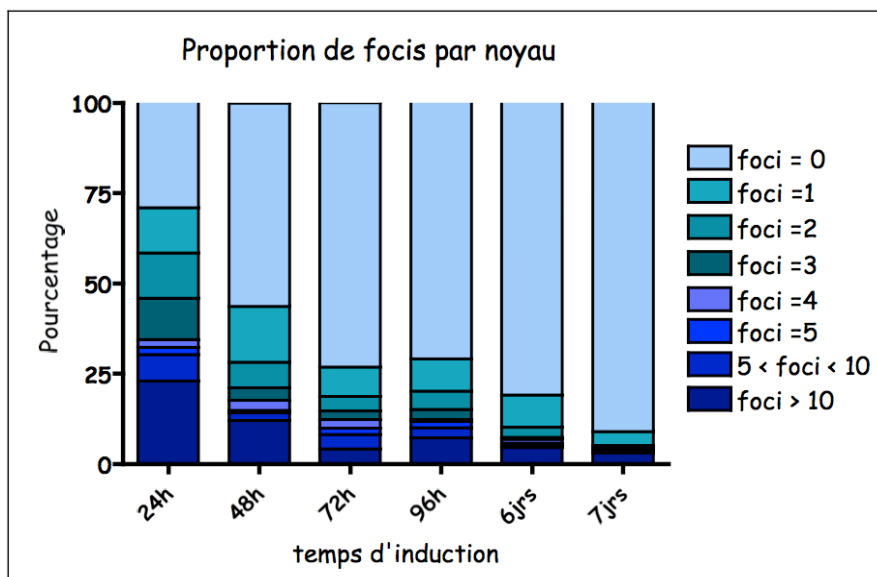


Figure 15 : Répartition du nombre de foci par noyau au cours du temps après induction des cellules transduites avec la construction 960 CTG inductible

On constate une augmentation du nombre de cellules ne contenant aucun foci au cours du temps.

La détection des agrégats par FISH (*figure 14*) montre la présence de foci après 24 heures d'induction, et ce, dans 75% des cellules. En comptabilisant le nombre de noyaux possédant des foci, ainsi que le nombre de foci par noyaux, nous avons remarqué une diminution globale de la proportion de cellules présentant des foci au cours du temps (*figure 15*). En effet, après 48 heures d'induction, 50% des cellules possèdent encore des foci et après 72 heures, seuls 25% des cellules présentent toujours des agrégats. Malgré une induction constante, on note une disparition progressive des cellules capables de former des foci. Afin de déterminer si les cellules non transduites avaient un avantage prolifératif permettant d'expliquer ce résultat, nous avons vérifié leur capacité de prolifération.

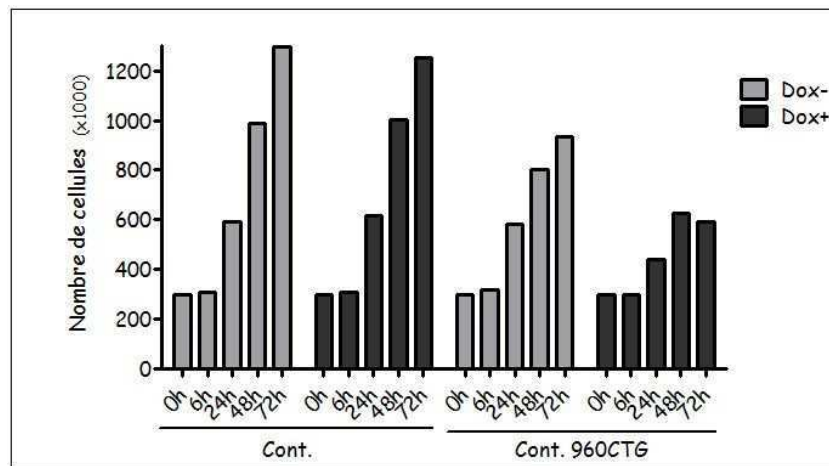


Figure 16 : Prolifération des cellules transduites ou non avec ou sans doxycycline

Les cellules transduites par la construction 960CTG inducible voient leur taux de prolifération diminué lors de l'ajout de la Dox contrairement aux cellules contrôles.

La *figure 16* montre que la doxycycline ne modifie pas la prolifération des myoblastes contrôles. La prolifération des cellules ayant intégrées la construction 960CTG est légèrement ralentie après 24h de culture en absence de doxycycline comme indiqué par un nombre plus faible de cellules à 48 et 72h et une absence de mort cellulaire. En présence de doxycycline, la prolifération est altérée dès 24h de traitement et, après 48h, le nombre de cellules n'augmente plus. Les nombreux débris cellulaires observés à 72h dans le milieu de culture des myoblastes transduits et induits par la Dox, suggèrent qu'un processus de mort cellulaire, plutôt qu'un arrêt de la prolifération, est responsable de la diminution du nombre de cellules exprimant les répétitions CUG après 72h. Une expérience préliminaire visant à caractériser la mort cellulaire par FACS (à l'aide de marquage au 7- Amino Actinomycine D) au cours de cette cinétique n'a pas été concluante et doit être renouvelée afin de confirmer cette hypothèse.

Malgré ces limites, ce modèle présente néanmoins l'avantage de pouvoir induire l'expression des répétitions CTG pathologiques et d'analyser les événements précoces entraînés par la présence des agrégats d'ARN-CUG.

II.2. Conséquences de l'expression des répétitions CTG

a. Répercussions sur le statut redox des cellules

La caractérisation des myoblastes exprimant les répétitions CTG inducibles, nous a permis de définir une fenêtre de temps de 24h à 48h post-induction pour l'étude des altérations moléculaires induites par l'apparition de foci nucléaires d'ARN (CUG)_{exp}. Tout d'abord, nous avons vérifié si la formation des foci, via l'induction de notre construction contenant 960 CTG interrompus, entraînait une augmentation de ROS intracellulaires similaire à celle observée dans les myoblastes DM1. La quantité de ROS produite par les cellules traitées à la Doxycycline a été mesurée après 6h et 24h, par la technique par fluorescence au DCF.

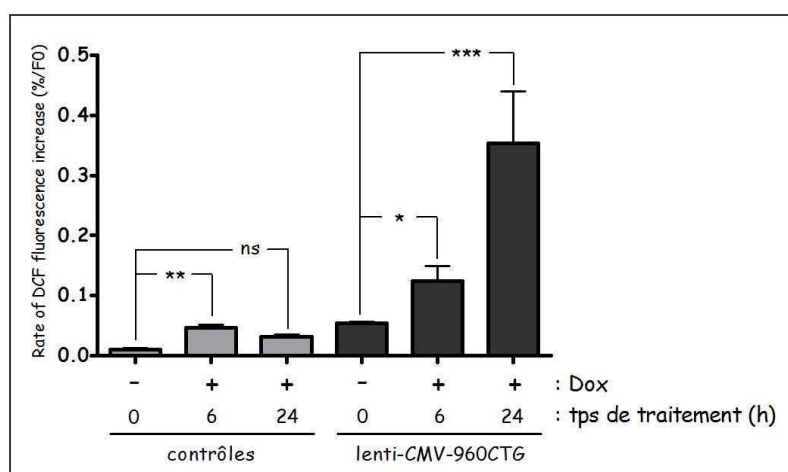


Figure 17 : Quantification des ROS par fluorescence au DCF

Augmentation de la quantité de ROS dans les cellules exprimant les ARN contenant les répétitions CUG.

La *figure 17* indique que l'addition de doxycycline dans des myoblastes contrôles induit une augmentation significative mais faible des ROS intracellulaires. Ce niveau est comparable à celui retrouvé dans les cellules transduites par la construction 960 CTG mais non-traitées à la doxycycline. En revanche, les cellules exprimant les ARN-960 CUG montrent une augmentation significative d'environ 2 fois de la quantité de ROS dès 6 heures de traitement à la doxycycline, et après 24h, le niveau de ROS est augmenté de plus de 6 fois par rapport aux mêmes cellules non-induites.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec des myoblastes primaires isolés de patients DM1 et suggèrent que l'expression des ARN contenant de grandes expansions CTG,

associée à la formation de foci, a pour conséquence une augmentation des ROS intracellulaires et contribue à la modification du statut redox des myoblastes DM1.

b. Modulation de l'expression de $p16^{\text{INK4A}}$

Suite aux résultats indiquant que l'expression des ARN-CUG conduit à une augmentation de la quantité de ROS dans les myoblastes, nous avons vérifié si les observations effectuées dans les myoblastes DM1 étaient retrouvées dans ce modèle cellulaire inducible. Dans un premier temps, nous avons examiné l'activation de p16 suite à l'expression des ARN-960CUG.

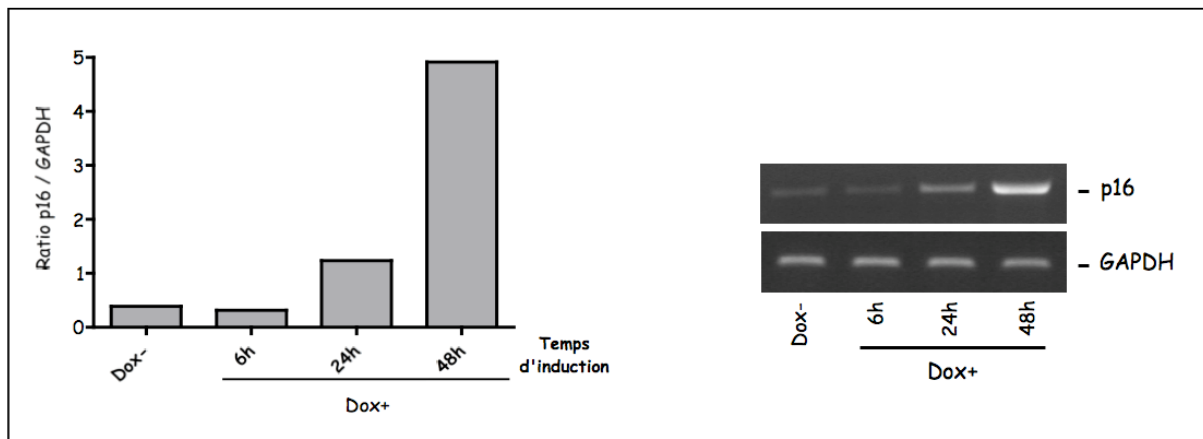


Figure 18 : Quantification de l'ARNm p16 par RT-PCR après induction à la doxycycline

L'induction de la construction 960CTG par la Dox conduit à une augmentation de l'ARNm p16.

Le taux d'ARNm p16 dans les cellules transduites par le lentivirus 960CTG inducible, a tout d'abord été vérifié par RT-PCR (*figure 18*). Nous avons observé une augmentation de la quantité d'ARNm p16 après 24h de traitement à la doxycycline. Ce résultat suggère une corrélation entre l'expression de la mutation DM1, conduisant à la formation des agrégats nucléaires d'ARN-CUG, et l'expression de $p16^{\text{INK4A}}$.

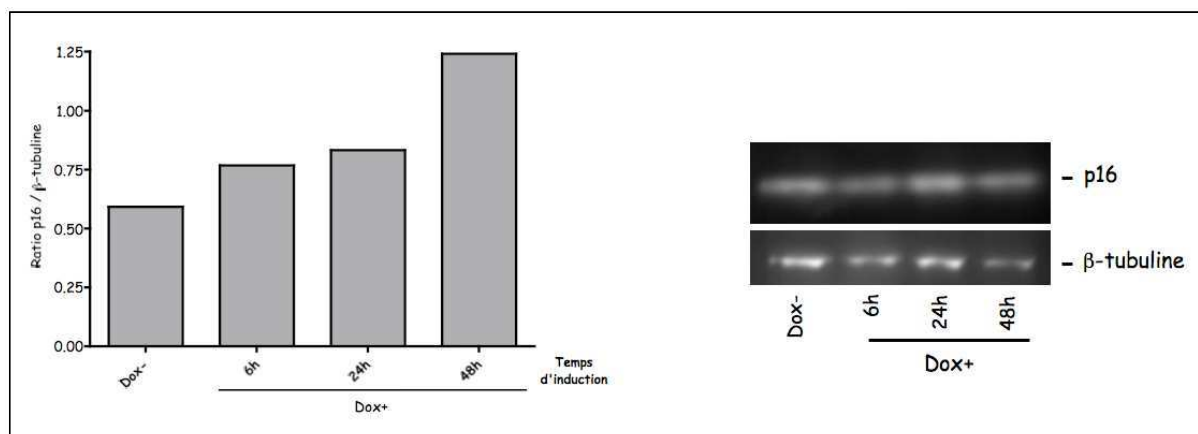


Figure 19 : Quantité de protéine p16 dans les cellules 960CTG au cours d'une induction par la Doxycycline
Le taux de protéines p16 est doublé 48h après l'induction d'expression des ARN-960CUG.

Nous avons ensuite mesuré la quantité de protéines p16 retrouvées dans les cellules transduites et induites par la Dox (*figure 19*). L'analyse par western blot de la quantité de protéines p16 confirme l'augmentation des ARNm p16 mesurée par RT-PCR. Ainsi, après 48h de traitement, la quantité de protéines p16 est doublée par rapport aux cellules non traitées. Ces résultats soutiennent donc l'hypothèse d'un lien entre la présence d'ARN-CUG pathologiques et une activation anormale de la voie p16^{INK4A}.

c. Activation des MAPKinases

Afin de déterminer si les voies de signalisation connues pour réguler l'expression de p16 sont altérées par l'expression des ARN-CUG, nous avons mesuré l'activité de p38 et Erk par western blot après différents temps d'induction.

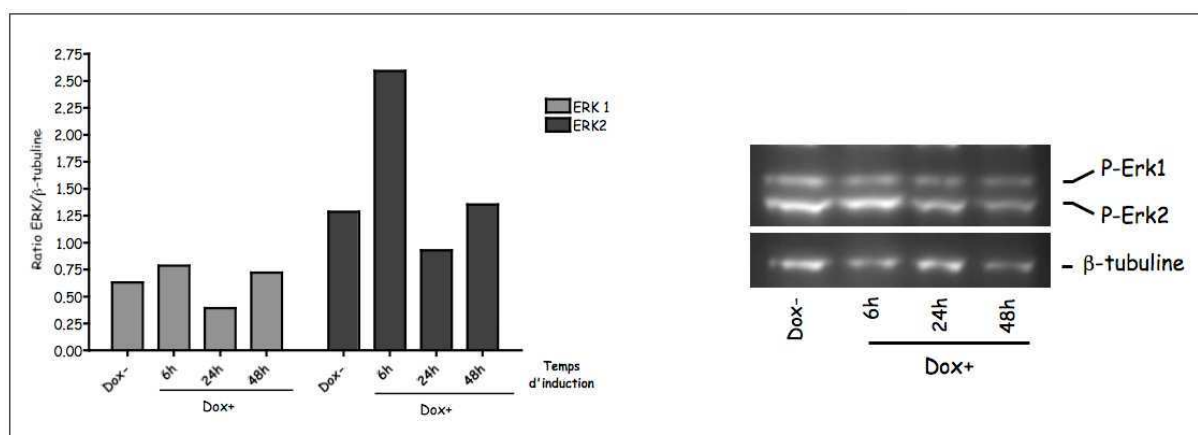


Figure 20 : Quantification par western blot de la phosphorylation des MAPKinase Erk 1 et 2
On note un pic d'activation de la protéine Erk 2 à 6h d'induction à la Doxycycline.

II. Développement d'un modèle DM1 inducible

Après avoir observé une activation spécifique de la MAPKinase Erk1/2 dans les myoblastes DM1 au niveau basal mais également après un stress oxydant, nous avons vérifié si cette cascade de signalisation était également altérée suite à l'expression des ARN-CUG dans notre modèle inducible (*figure 20*). Les niveaux de Erk 1 et 2 phosphorylés ont été mesurés par western blot et un pic d'activité de Erk 2 a été détecté de manière transitoire après 6h d'induction alors qu'aucune augmentation n'a été observée pour Erk1.

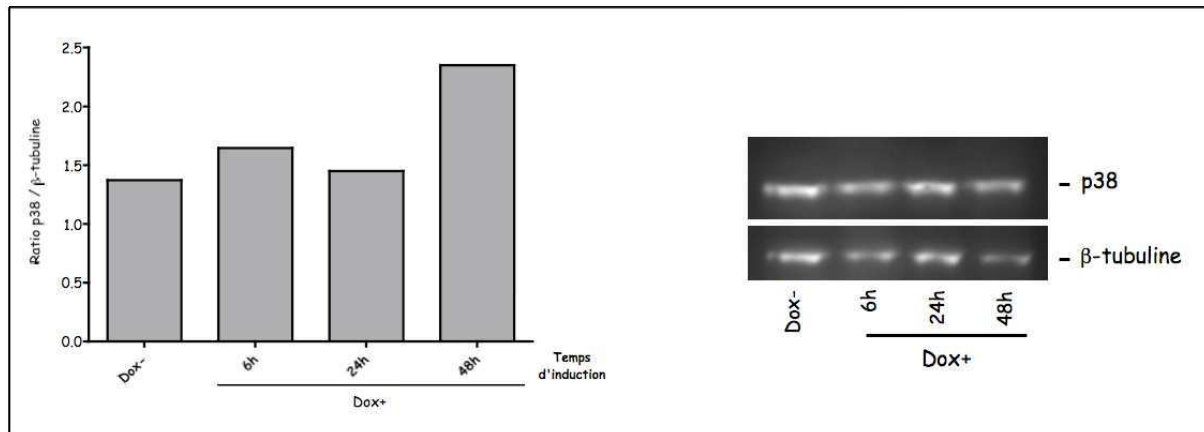


Figure 21 : Quantification par western blot du taux de p38 phosphorylé après induction à la doxycycline

La présence d'ARN contenant des répétitions CUG entraîne une augmentation de la forme active de p38 après 48h de traitement à la Dox.

L'activation de p38 a également été mesurée par western blot suite à l'expression des ARN-CUG dans notre modèle inducible (*figure 21*). Le niveau de p38 phosphorylée ne varie pas lors des premières 24h de traitement. En revanche, une augmentation d'environ 50% de la quantité de p38 phosphorylé est observée après 48h d'induction des ARN-CUG.

Les profils d'activité de Erk1/2 et de p38 mesurés dans ce modèle inducible de 960 répétitions CTG interrompues, ne sont pas identiques à ceux que nous avons observé dans les myoblastes DM1 isolés de patients DM1 soumis ou non à un stress oxydatif. Cependant, nous avons montré que l'expression des ARNm contenant de grandes répétitions CUG induit rapidement, c'est à dire après 6h de traitement, une production de ROS intracellulaires et active précocement les MAPKinases Erk2, ces deux paramètres étant également modifiés dans les myoblastes DM1 ayant une expression constitutive d'ARN-CUG. Ces expériences nécessitent d'être approfondies et complétées afin de confirmer les résultats obtenus et d'établir un lien entre les ARN-CUG, la production de ROS, l'activité accrue de Erk2 et l'activation de p16 dans les deux modèles cellulaires.

II.3. Utilisation de cet outil dans la mise en évidence du rôle de p68 dans la modulation de l'activité de MBNL1.

a. p68 est impliqué dans la physiopathologie de la DM1

L'hélicase DDX5/p68 fut identifiée au cours d'une recherche par chromatographie d'affinité sur des séquences d'ARN (CUG)₉₅ biotinylées, de nouveaux facteurs impliqués dans la physiopathologie de la DM1. p68 est impliquée dans différents aspects du métabolisme des ARN, comme la transcription, le traitement des ARN, leur export, leur traduction ainsi que leur dégradation (Fuller-Pace 2006; Janknecht 2010). En effet, cette hélicase permet de séparer deux brins d'ARN complémentaires et ainsi de favoriser la fixation de molécules à ces brins d'ARN. Elle est donc ressortie comme un candidat intéressant, pouvant être impliqué dans les mécanismes de recrutement de certaines protéines sur les répétitions d'ARN CUG dans la DM1 (Laurent, Sureau et al. 2011).

b. Rôle de p68 dans la fixation de MBNL1 aux répétitions CUG

Dans un premier temps, cette étude a permis de constater que p68 colocalisait avec le facteur Muscleblind 1 (MBNL1), mais également avec les foci. Les différents résultats obtenus ont ainsi suggéré que p68 facilitait de façon spécifique, la fixation de MBNL 1 sur les répétitions CUG (*figure 22*).

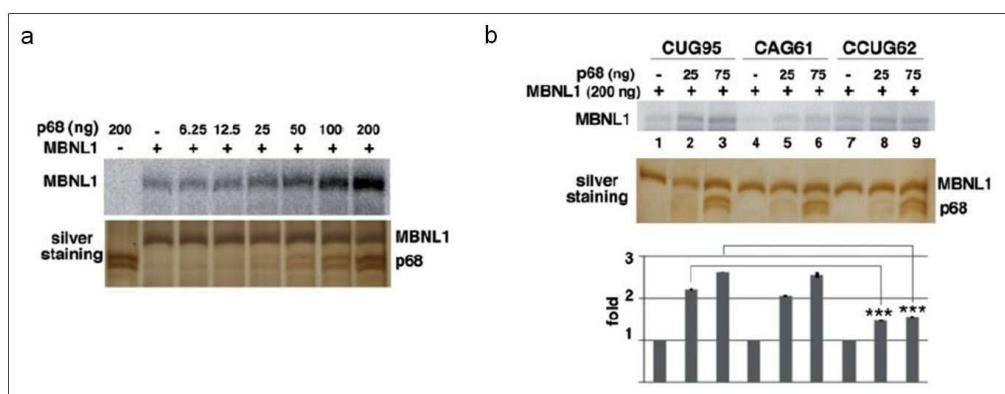


Figure 22 : Augmentation de la fixation de MBNL1 sur les répétitions CUG en présence de p68.

(a) L'ajout de p68 entraîne une augmentation proportionnelle des capacités de fixation de MBNL1 sur les répétitions d'ARN (CUG)₉₅. (b) Le rôle de p68 dans l'activation de la fixation de MBNL1 sur les séquences d'ARN répétées est dépendant de ces mêmes séquences. (Laurent, Sureau et al. 2011)

Or, ce facteur d'épissage a été décrit comme nécessaire à la formation des foci nucléaires (Dansithong, Paul et al. 2005). Afin de vérifier l'importance de p68 dans la formation des agrégats nucléaires, des cellules musculaires humaines furent transduites par la construction 960-CTG inducible. 48 heures avant induction des répétitions (CUG)₉₆₀ par la doxycycline, les cellules ont été traitées ou non par des siRNA dirigés contre p68. La *figure 23* permet de constater qu'après seulement une heure de traitement, environ 50% des cellules non traitées par le siRNA p68 présentent des foci. En revanche, le nombre de noyaux comportant des agrégats fut significativement réduit dans les cellules où p68 fut inhibée, principalement dans les temps précoces suivant l'induction par la Doxycycline (1, 3 et 6h). Après 24 heures d'induction, aucune différence significative n'est plus observable entre les cellules traitées et non-traitées par le siRNA p68.

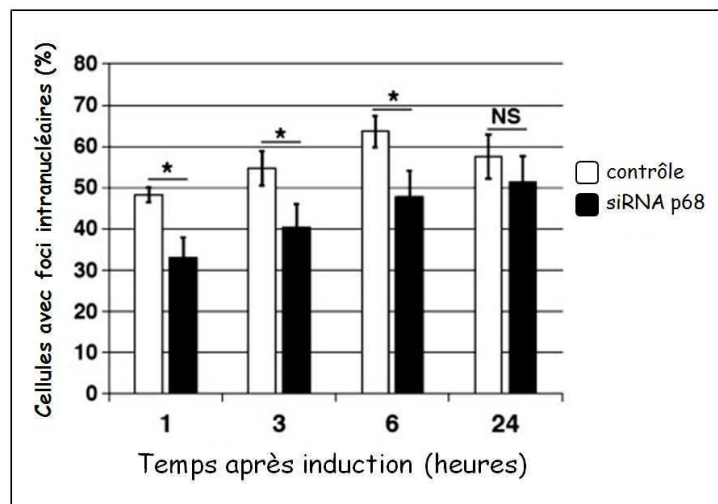


Figure 23 : Rôle de p68 dans la formation des agrégats nucléaires

En absence de p68, on observe une diminution significative de la proportion de cellules comportant des foci au cours des 6 premières heures suivant l'induction de l'expression des (CUG)₉₆₀. (Laurent, Sureau et al. 2011)

Ces résultats suggèrent l'importance de p68 dans la formation des foci d'ARN, son rôle serait de faciliter la fixation de MBNL1 aux séquences d'ARN CUG répétées, mais également que cette interaction reste transitoire.

La construction inducible (CUG)₉₆₀, a contribué à une meilleure compréhension des mécanismes opérant dans les temps précoces de la formation des foci et les liens existant entre ces foci, MBNL 1 et p68/DDX5. Cette étude aura également permis de mettre en avant l'importance de p68 dans les phénomènes d'épissage alternatif, et notamment la Troponine T cardiaque (TNNT2).

Partie III

Expression de répétitions CTG

interrompues dans le muscle

III. Expression de répétitions CTG interrompues dans le muscle

III.1. But et méthodes

En parallèle du développement d'un nouveau modèle cellulaire DM1 inducible, nous avons incorporé la séquence de 960 répétitions CTG interrompues dans un plasmide permettant la production de vecteurs viraux de type AAV (Adeno-Associated Virus). Contrairement aux vecteurs lentiviraux qui permettent de transduire efficacement les myoblastes *in vitro*, les vecteurs AAV permettent une très bonne transduction des fibres musculaires *in vivo*. Cet outil va nous permettre d'étudier *in vivo* les mécanismes altérés par les ARNs contenant de grandes répétitions CTG. Une approche similaire a déjà été développée par l'équipe de Cooper qui a généré une souris transgénique permettant l'expression conditionnelle des répétitions 960 CTG interrompues (Kuyumcu-Martinez, Wang et al. 2007; Wang, Kearney et al. 2007; Orengo, Chambon et al. 2008). D'un point de vue moléculaire, ce modèle a mis en évidence la formation de foci nucléaires, la séquestration de MBNL1 ainsi qu'une dérégulation de CELF1 (CUGBP1) et une perturbation de l'épissage. D'un point de vue histo-pathologique et physiologique, ce modèle a présenté une cardiomyopathie dilatée ainsi qu'une dégénérescence rapide du muscle. N'ayant pas accès à ce modèle, nous avons développé une approche virale de type AAV permettant d'exprimer les ARN-CUG dans un muscle de souris. Afin de caractériser et valider notre modèle, nous avons injecté $1,2 \times 10^{11}$ particules d'AAV2/1-CMV-960CT et AAV2/1-CMV-GFP dans le tibialis antérieur (TA) de souris wt et analysé la formation de foci ainsi que les altérations d'épissage spécifique de la DM1. L'expression d'un transgène délivré par un vecteur AAV2 /1 dans un muscle étant détectable deux semaines après l'injection du virus (Qiao, Koo et al. 2011), nous avons analysé les muscles injectés entre 2 et 10 semaines.

III.2. Détection de foci nucléaires

Les coupes de muscles TA (*Tibialis Anterior*) injectés avec la construction CMV-960CTG, ont été hybridées avec une sonde de type 2'Ome-CAG7 couplée au fluorochrome Cy3 qui permet de détecter les agrégats d'ARN-CUG par FISH.

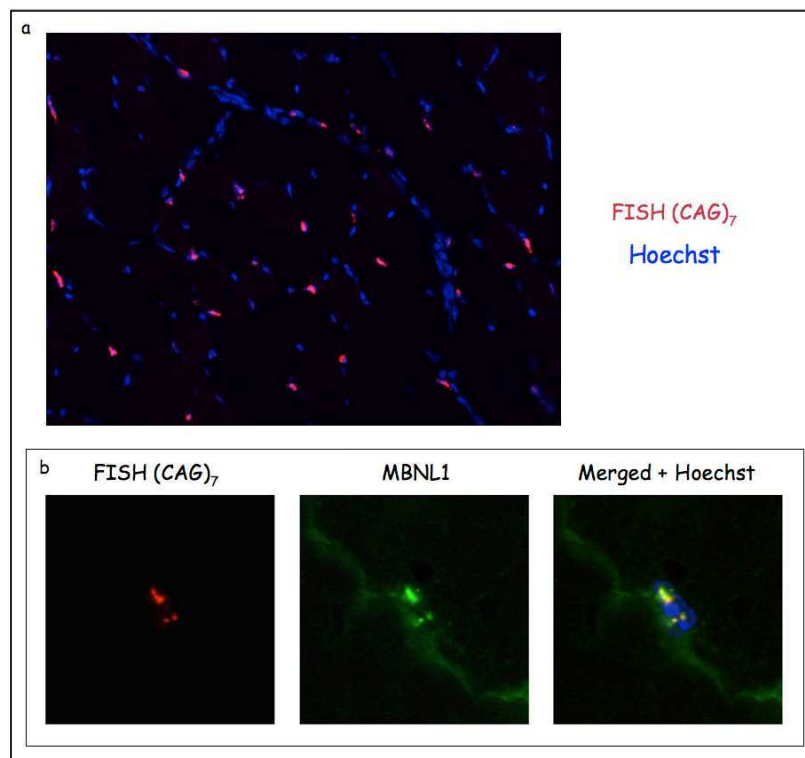


Figure 24 : FISH anti-(CAG)₇ et immunofluorescence anti-MBNL1 sur des coupes de TA infectées

(a) Les noyaux des fibres musculaires infectées par la construction AAV-CMV-960CTG présentent des foci. (b) Les agrégats nucléaires d'ARN CUG colocalisent avec le facteur d'épissage MBNL1 (Muscle Blind Like 1) comme dans les cellules issues de patients DM1.

Comme illustré en *figure 24a*, on détecte la présence de foci d'ARN-CUG dans les noyaux des fibres musculaires transduites par les AAV-CMV-960CTG dès deux semaines post-injection. Ces foci sont présents dans plus de la moitié des fibres musculaires. Cette proportion de noyaux comportant des foci est observée jusqu'à 4 semaines post-injection pour ensuite diminuer entre 6 et 10 semaines. Ainsi, nous avons confirmé que notre construction permet la production d'ARN-CUG et la formation de foci nucléaires dans le muscle de souris. De plus, comme dans le tissu de patients DM1, les foci d'ARN-CUG colocalisent avec la protéine MBNL1 détectée par immunofluorescence (*figure 24b*).

III.3. Impact sur l'épissage alternatif

Nous avons ensuite voulu vérifier si l'expression des ARN-CUG produits par notre construction, altérait l'épissage alternatif des transcrits spécifiquement dérégulés dans la DM1. En effet, la perte de fonction des protéines MBNL1 séquestrées par les foci et/ou la stabilisation de CUGBP1, induites par les ARN-CUG, conduisent à une perturbation de l'épissage alternatif de certains ARNm comme *Clcn-1*, *Bin1* et *SERCA/Atp2a1*. Ainsi, une exclusion de l'exon 22 des transcrits *SERCA/Atp2a1* est observée dans le muscle de patients DM1 ainsi que dans les modèles de souris HSA ou MBNL-KO.

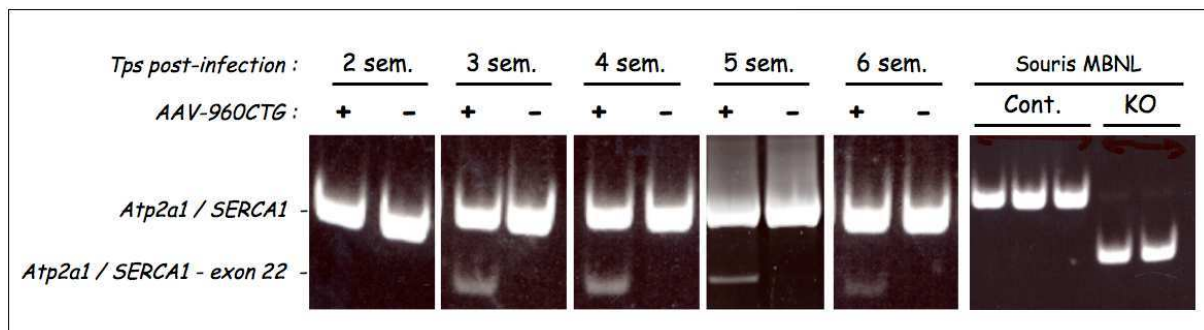


Figure 25 : Epissage alternatif de SERCA1/Atp2a1

Les souris MBNL-KO présentent une exclusion quasi-totale de l'exon 22 de SERCA1 (partie droite) alors que les souris infectées par l'AAV-CMV-960CTG ne montrent qu'une faible exclusion de cet exon de 3 à 6 semaines post-infection (partie gauche).

L'analyse par RT-PCR des transcrits SERCA1 (*figure 25*) montre que la forme tronquée, sans exon 22, de SERCA1 est présente à partir de la 3^{ème} semaine post-infection dans les TA injectés et que cette isoforme tend à disparaître dès la 5^{ème} semaine. Au-delà, on ne constate plus d'épissage de l'exon 22 (résultats non présentés). Cependant, cette altération est faible puisque dans les souris MBNL1 KO, la quasi-totalité des transcrits SERCA1 ne contient pas d'exon 22, confirmant un retour vers un épissage fœtal.

III.4. Régénération intensive

Après avoir confirmé la présence de foci d'ARN-CUG ainsi qu'une altération de la maturation des ARN de SERCA1, nous avons examiné le muscle des souris injectées avec les AAV-CMV-960CTG entre 2 et 10 semaines post-injection.

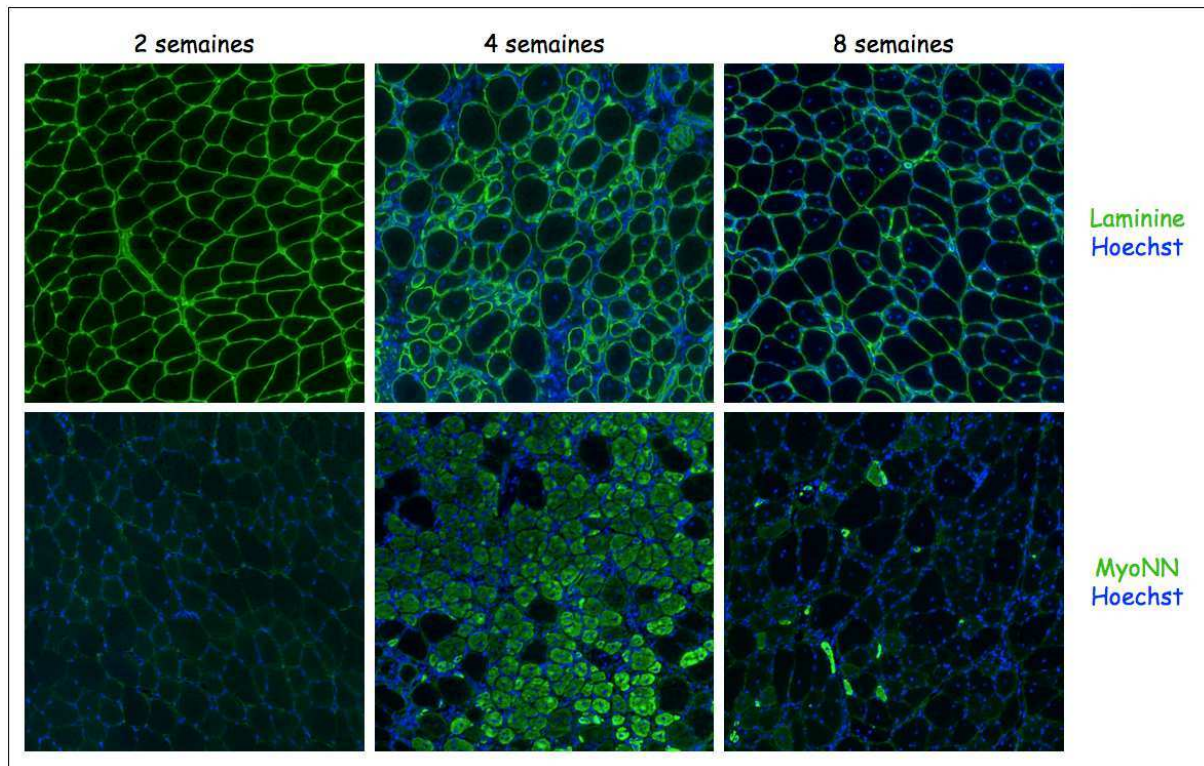


Figure 26 : Immunofluorescence sur des coupes de muscle de souris infectées par AAV-960CTG

Le marquage des fibres par un anticorps anti-Laminine (clichés supérieurs) permet de constater une dégénérescence massive à partir de 4 semaines post-infection. Le marquage de la Myosine néo-natale permet la visualisation d'une régénération importante au cours de la quatrième semaine (clichés inférieurs).

Les fibres ont été visualisées à l'aide d'un immuno-marquage dirigé contre la laminine et les noyaux sont identifiés avec un marquage au Hoechst (*figure 26*). On peut noter une altération globale du muscle quatre semaines après l'injection, avec une variabilité importante de la taille et de la forme des fibres (fibres rondes et de taille réduite), ainsi qu'un nombre important de noyaux en périphérie des fibres pouvant correspondre à des infiltrats de cellules inflammatoires. De plus, une forte augmentation de noyaux centraux apparaît à partir de 4 semaines post-transduction. A des temps plus tardifs, notamment à 8 semaines post-injection, on constate une amélioration de la structure générale du muscle. Cependant, la proportion de fibres centro-nucléées reste stable, à 60%, au cours du temps (*figure 27a*).

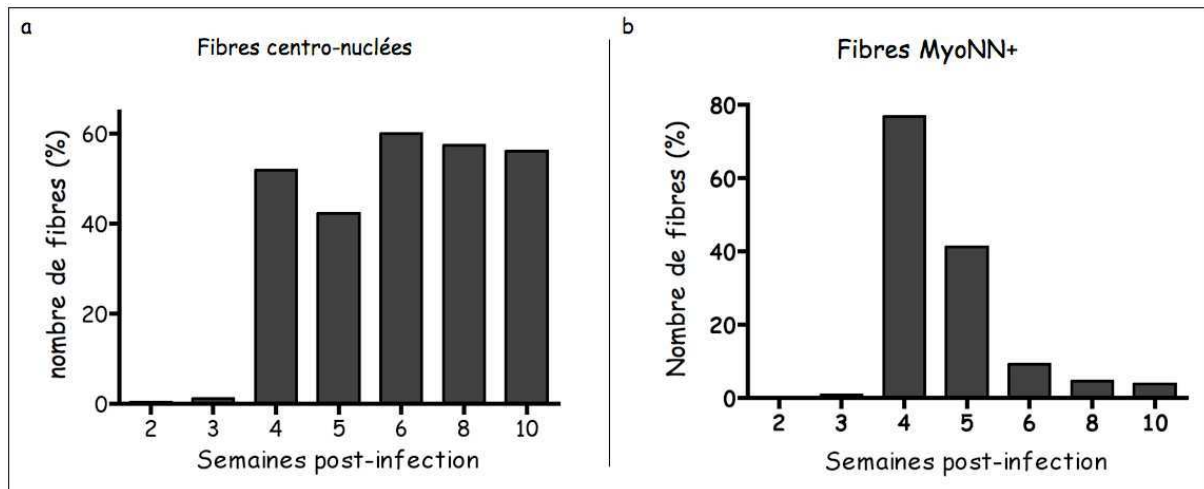


Figure 27 : Mesures des pourcentages de fibres centro-nucléées et positives pour la Myosine néo-natale au cours du temps.

Au cours de la quatrième semaine post-infection, on constate une forte augmentation du nombre de fibres centro-nucléées pouvant être attribuée à un phénomène type DM1 ou de type dégénération/régénération (a) ainsi qu'un pic d'expression de la myosine néo-natale (b) caractéristique d'une régénération des fibres.

La présence de noyaux centraux dans les fibres musculaires est généralement associée au phénomène de régénération. Cependant, chez les patients DM1, on constate également la présence de noyaux centraux, mais ils ne sont pas associés à un processus de dégénération/régénération intense comme dans d'autres dystrophies musculaires. Afin de définir l'impact physiologique de l'expression de notre construction CMV-960CTG sur le muscle, nous avons tout d'abord examiné l'implication d'un processus de dégénération/régénération dans le phénotype musculaire observé. Pour cela, nous avons examiné la présence de myosine néo-natale (MyoNN) qui est exprimée dans les fibres nouvellement formées. De plus, cette expression est transitoire, ayant cours pendant une semaine après le début de la phase de régénération. La *figure 27b* permet de constater qu'un phénomène massif de dégénérescence s'est produit à partir de la troisième semaine post-injection puisqu'un nombre important de fibres musculaires (près de 80%) expriment la myosine néo-natale. Les marquages réalisés à des temps plus tardifs, montrent une diminution du pourcentage de fibres MyoNN positives. Dès la cinquième semaine, le nombre de fibres MyoNN positives a diminué de moitié pour ensuite atteindre moins de 10% à partir de la 6^{ème} semaine (*figure 27b*).

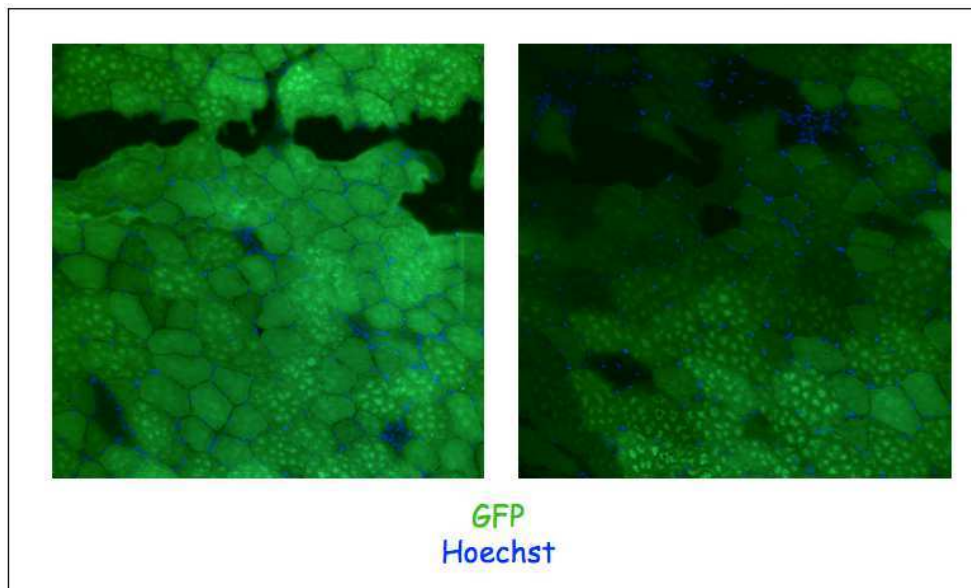


Figure 28 : Expression de la GFP dans les fibres infectées par l'AAV-CMV-GFP

Deux exemples de coupes de muscles infectées par AAV-CMV-GFP, à 4 semaines post-infection.

Les fibres possèdent une structure normale et aucun noyau central ni aucune infiltration de cellules inflammatoires ne sont observés.

L'expression du transgène, contenant l'expansion de répétitions CTG conduisant à la formation des foci nucléaires, va donc avoir pour conséquence une détérioration massive de l'intégrité des fibres musculaires. Afin de confirmer que le phénomène de régénération observé dans les muscles infectés est bien dû à l'expression de la construction AAV-CMV-960CTG et non juste à l'infection virale, nous avons également infecté des muscles à l'aide d'un AAV-CMV-GFP. L'observation des coupes de muscles ainsi traitées permet de confirmer que, malgré l'expression de la GFP, les fibres musculaires ne présentent pas de noyaux centraux. De plus, contrairement aux muscles infectés par l'AAV-CMV-960CTG, ils ne présentent pas d'infiltrats et les fibres possèdent une structure normale (*figure 28*). Ainsi, l'expression des répétitions 960 CTG interrompues entraîne une régénération massive du muscle, quatre semaines après l'injection des AAV. L'étude des mécanismes précocement altérés par l'expression d'ARN-CUG dans ce modèle, devra donc être réalisée vers 3 semaines, période au cours de laquelle on détecte des foci, des défauts d'épissage et pas d'altération majeure du muscle.

Discussion

La mutation à l'origine de la dystrophie myotonique de type 1, dystrophie musculaire la plus fréquente chez l'adulte, est une expansion de répétitions CTG dans la région 3'UTR du gène de la *DMPK*. Les atteintes en résultant sont multi-systémiques mais affectent plus particulièrement les muscles squelettiques et cardiaques, ainsi que le système nerveux central. L'un des principaux symptômes, en plus de la myotonie, est la dystrophie, caractérisée par un affaiblissement progressif et une atrophie de différents muscles squelettiques. Plusieurs travaux ont montré que l'expression de ces expansions CTG altérait le programme myogénique et perturbait le comportement des cellules satellites qui assurent le maintien de la masse musculaire et la régénération du muscle (Amack and Mahadevan 2001; Amack, Reagan et al. 2002; Amack and Mahadevan 2004; Pelletier, Hamel et al. 2009). Des travaux du laboratoire ont également montré que la capacité proliférative des cellules satellites isolées à partir de biopsies de patients DM1, est fortement diminuée par rapport à des cellules issues d'individus sains (Furling, Coiffier et al. 2001; Thornell, Lindstrom et al. 2009). Plus récemment, nous avons établi qu'une activation précoce de la voie de stress p16^{INK4A} était responsable de l'arrêt prolifératif prématuré des cellules DM1 (Bigot, Klein et al. 2009). En effet, l'inhibition de cette voie, à l'aide d'une surexpression de CdK4, le ligand naturel de p16, a permis aux cellules DM1 de récupérer une capacité proliférative équivalente à celle des cellules contrôles. Cependant, le ou les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation précoce de cette voie, et donc dans l'arrêt prématuré des myoblastes DM1, ne sont pas connus. Au cours de cette étude, nous avons cherché à définir les mécanismes impliqués dans l'activation précoce de la voie de stress p16^{INK4A}, suite à la présence de la mutation DM1. Différents types de stress sont connus pour leur capacité d'activation de cette voie p16^{INK4A}. De plus, certaines études ont suggéré que l'expression de la mutation DM1 pouvait mener à une hyper-sensibilité des cellules DM1 face au stress oxydatif (Usuki and Ishiura 1998; Toscano, Messina et al. 2005). Ces résultats nous ont conduit à tenter de définir les relations entre la présence des répétitions CTG à l'origine de cette pathologie, la sensibilité accrue au stress des cellules DM1 et l'activation prématurée de la voie p16.

Dans un premier temps, nous avons examiné la différence de sensibilité au stress oxydatif des myoblastes DM1 par rapport aux myoblastes contrôles. Pour cela, nous avons utilisé des cultures primaires de myoblastes cDM1 (présentant environ 2000 répétitions CTG) et contrôles que nous avons cultivé en conditions oxydantes : 3% (normoxie physiologique) ou 19% d'oxygène. Les myoblastes DM1 cultivés sous 3% d'oxygène ont vu leur capacité proliférative augmenter de 29% par rapport à ceux cultivés à 19% d'O₂, alors que pour des

cellules contrôles, l'augmentation de la capacité proliférative se limite à 9% (*I.1 figure 1*). Ce résultat suggère que les myoblastes DM1 sont plus sensibles à un environnement oxydant que les myoblastes contrôles, et que la composante oxydative contribue à l'arrêt prématuré de ces cellules. Cependant, même dans un environnement moins oxydant (3% contre 19% d'oxygène), les cellules DM1 n'ont pas récupéré une capacité proliférative équivalente à celle des cellules contrôles. Ce résultat peut être expliqué par le fait que les cellules cultivées à 3% d'oxygène sont sorties régulièrement de leur enceinte pour les observations et passages. Au cours de cette expérience, nous avons cherché à limiter au maximum ces opérations. Malgré tout, les manipulations d'entretien des cultures ont entraîné des passages réguliers des cellules à des conditions atmosphériques (19% d'oxygène). Les différentes opérations réalisées sur les cellules cultivées à 3% d'O₂, sont donc été autant d'épisodes de stress oxydatif pour celles-ci. Du fait de leur sensibilité plus importante face au stress, on ne peut pas exclure que ces épisodes de stress répétés aient contribué à empêcher les cellules DM1 d'atteindre leur capacité proliférative maximale. Toutefois, cette hypothèse n'est valable qu'en admettant que le stress perçu par les cellules DM1 soit le seul responsable de leur perte de capacité proliférative. Cependant, il est probable que l'augmentation de sensibilité au stress des cellules DM1 ne soit qu'un des facteurs qui contribuent à l'arrêt précoce de celles-ci.

Ces résultats nous ont poussé à examiner le niveau basal de ROS afin de déterminer si cette composante pouvait contribuer à la différence de sensibilité au stress oxydatif des myoblastes DM1 qui fut observée indirectement lors du suivi de la vie proliférative de ces cellules. Ces mesures nous ont permis de mettre en évidence un niveau basal de ROS significativement plus élevé dans les cellules DM1 que dans les cellules contrôles dans des conditions classiques de culture (19% O₂) (*I.2 figure 2*). Les deux types de myoblastes ayant été cultivés dans des conditions similaires, cette augmentation de ROS intracellulaires dans les myoblastes DM1, est la conséquence d'une production intrinsèque de ROS en réponse à un stress cellulaire induit par la mutation ou d'une capacité de régulation des ROS plus faible en présence de la mutation. Dans les deux cas, la conséquence de ces dérégulations est un niveau basal de ROS plus élevé dans les cellules DM1, pouvant contribuer à la susceptibilité accrue de ces cellules face à un stress oxydatif additionnel.

Parallèlement, nous avons observé que l'augmentation de la capacité proliférative des cellules DM1 cultivées à 3% d'oxygène, corrélait avec une expression plus tardive des ARNm p16^{INK4A} par rapport aux mêmes cellules cultivées à 19% d'oxygène (*I.3 figure 3*). Ce décalage n'a pas été observé dans les cellules contrôles soumises aux mêmes contraintes. De

plus, il est apparu que le niveau d'ARNm p16 dans les cellules DM1 cultivées à 3% d'O₂, était diminué de moitié par rapport aux cellules placées à 19% d'O₂, et ce, jusqu'à leur entrée en phase de sénescence. Ces résultats indiquent que le stress oxydatif ou la sensibilité accrue des myoblastes DM1 au stress oxydatif contribue à l'activation de la voie p16 dans ces cellules, et donc à leur capacité proliférative limitée.

Cependant, le ou les mécanismes moléculaires responsables de l'activation précoce de la voie p16 conduisant à un arrêt prématuré des cellules DM1, ne sont pas encore identifiés. Il a été montré que l'expression de p16 pouvait être régulée de manière transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Des régulations post-transcriptionnelles des ARNm p16 par les protéines de la famille AUF1 ainsi que par le micro-ARN miR-24 ont ainsi été proposées au cours de plusieurs études. L'isoforme p37 de AUF1 a été décrite comme un régulateur de la stabilité de l'ARNm p16. En se fixant sur cet ARNm, p37 favorise sa dégradation. De la même façon, il a été montré que miR-24 possède également une importante affinité pour l'ARNm p16. L'interaction de ce micro-RNA sur l'ARN p16 conduit au blocage de la traduction de la protéine p16. La dérégulation de l'épissage alternatif de certains transcrits et plus récemment, de l'expression de certains micro-RNA ayant été décrite dans la DM1 (Perbellini, Greco et al. 2011; Rau, Freyermuth et al. 2011), il nous a semblé intéressant d'examiner le rôle potentiel d'AUF1 et de miR-24 sur la régulation de p16 dans notre modèle cellulaire.

L'analyse de l'expression de miR-24 suggère que la régulation de p16, observée dans les myoblastes humains, est indépendante de l'activité de ce micro-ARN. En effet, l'augmentation de miR-24 que nous avons mesuré au cours de la vie proliférative de cellules contrôles et DM1, ne corrèle pas avec l'augmentation d'ARN p16^{INK4A} responsable de l'arrêt prolifératif des cellules (*I.5 figure 5*). De plus, la diminution du taux d'oxygène dans les cultures de myoblastes DM1, entraîne une réduction du taux de miR-24 qui est difficilement compatible avec la diminution de p16 observée dans ce cas de figure.

En ce qui concerne AUF1, sa quantité globale diminue au cours de la vie proliférative des myoblastes et le profil d'expression des différentes isoformes d'AUF1 est similaire entre les cellules contrôles et DM1 (*I.4 figure 4*). La régulation de l'épissage alternatif d'AUF-1, qui pourrait conduire à un changement de ratio des différentes isoformes et plus particulièrement, à une diminution de l'isoforme p37, ne semble pas modifiée dans les myoblastes DM1, ces derniers présentant le même type de profil que les cellules contrôles. Par ailleurs, une étude récente de Guo & al., a montré que l'induction de p16, suite à un stress

oxydatif au peroxyde d'hydrogène, était médiée par une diminution d'AUF1 (Guo, Ma et al. 2010). Dans notre modèle cellulaire, la quantité totale d'AUF1 ainsi que la proportion des différentes isoformes, ne varie pas de manière significative entre les cellules contrôles et DM1 après un traitement au H₂O₂ (*I.7 figure 8*). Ce résultat additionnel suggère que l'expression prématurée de p16 dans les myoblastes DM1 n'est pas la conséquence d'une dérégulation de l'épissage d'AUF1.

Au vu des résultats concernant la régulation post-transcriptionnelle de p16, nous nous sommes focalisés sur les voies de signalisation connues pour moduler la transcription de p16. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux voies susceptibles d'être également activées lors de stress oxydatif. C'est le cas de la voie p38 qui fait partie d'une cascade de signalisation faisant intervenir les molécules des familles MEK, MEKK et MKK. De plus, il a été montré que l'activation de cette voie peut participer au phénomène de sénescence répllicative (Iwasa, Han et al. 2003), mais également à la régulation de p16 (Spallarossa, Altieri et al. 2010). L'analyse de la forme phosphorylée, et donc active de p38, n'a révélée aucune différence entre les myoblastes contrôles et DM1 au niveau basal. Une augmentation de la fraction de protéines p38 phosphorylées est observée dans les deux types de cellules après un traitement au peroxyde d'hydrogène, mais aucune différence n'a été observée entre les cellules DM1 et contrôles (*I.8.c figure 11*), suggérant que la voie p38 n'est pas plus activée par le stress oxydatif accru dans les cellules DM1, et donc ne participe probablement pas à l'activation précoce de p16 dans notre modèle.

L'autre voie, celle des MAPK, fait intervenir différentes kinases (PKC, Erk et Mek) faisant partie d'une même cascade d'activation mais pouvant être activées de façon indépendante. L'activité de la PKC étant augmentée après l'induction des répétitions CTG interrompues dans un modèle murin (Wang, Kuyumcu-Martinez et al. 2009), nous avons mesuré son activité dans les myoblastes DM1 et contrôles. Cependant, aucune différence significative du niveau de PKC phosphorylées n'a été mesurée entre les myoblastes DM1 et contrôles. De plus, après un traitement au peroxyde d'hydrogène, on constate une augmentation du taux de PKC actives uniquement dans les cellules contrôles et pas dans les cellules DM1 (*I.8.a figure 9*). La présence de grandes répétitions CTG dans des myoblastes DM1 ne semble donc pas altérer l'activité de la PKC. Toutefois, l'anticorps utilisé dans notre étude détecte l'ensemble des différentes isoformes de PKC et une analyse des isoformes de façon séparée reste donc à être réalisée pour confirmer ce résultat.

Nous avons poursuivi notre analyse de la voie des MAPKinases en examinant les facteurs Erk 1 et 2. De la même façon que p38, Erk 1/2 peut être activé lors d'un stress oxydatif provoqué par une addition de peroxyde d'hydrogène (Guyton, Liu et al. 1996; Abe, Kartha et al. 1998) et participe également à l'activation de p16 (Wen-Sheng 2003; Kim and Wong 2009). Les résultats obtenus montrent que les niveaux de base de Erk 1 et Erk 2, sont respectivement 2 et 4 fois plus importants dans les myoblastes DM1 par rapport aux cellules contrôles. De plus, dans les myoblastes contrôles, seule une faible activation de Erk 1 et 2 est observée après un traitement à 200 μ M d' H_2O_2 , alors qu'une activation massive est constatée dès 100 μ M de peroxyde d'hydrogène dans les cellules DM1 (*I.8.b figure 10*). Ces résultats indiquent d'une part, une activité anormale de Erk 1/2 à l'état basal dans les myoblastes DM1, et d'autre part, une sur-activation spécifique de Erk 1/2 dans les cellules DM1 soumises à un stress oxydatif. Cette voie apparaît donc comme une candidate potentielle dans la régulation anormale de p16 dans les cellules DM1. Ainsi, nous avons mis en évidence une corrélation entre l'hyper-sensibilité des myoblastes DM1 face au stress oxydatif et une activité anormale de Erk 1/2. Cependant, le mécanisme impliqué dans l'activation précoce de p16 lorsque les myoblastes expriment des répétitions CTG pathologiques reste à définir.

Dans ce but, nous avons développé un modèle cellulaire permettant une expression inductible d'ARN contenant un grand nombre de répétitions CUG. Pour cette approche, nous avons inséré une séquence de 960 triplets CTG interrompus dans un plasmide permettant une expression conditionnelle du transgène en présence de doxycycline, tout en ayant le moins de fuites possibles en absence d'induction. Lors de la caractérisation des myoblastes contrôles ayant intégrés de manière stable notre construction, presque aucun foci nucléaires d'ARN-CUGexp ne fut détecté par FISH en absence d'induction par la doxycycline, ceci confirmant l'efficacité du verrouillage de du plasmide inductible. En revanche, 6 et 24 heures après l'addition de doxycycline, ces foci sont visibles dans les noyaux de 70% des cellules transduites avec le vecteur lentiviral contenant notre construction (*II.1.c figure 14a*). Au-delà de 48h, on constate une forte diminution du nombre de cellules contenant des foci, celle-ci étant probablement due à un effet cytotoxique de l'expression du transgène contenant les expansions CTG (*II.1.c figure 15*). Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette augmentation de mort cellulaire. Il est notamment possible que les cellules aient intégré un nombre trop important de copies de transgène ou encore que l'expression de la construction soit trop efficace. Dans les deux cas, on peut s'attendre à une expression massive des ARN-(CUG)₉₆₀ pouvant conduire à une séquestration trop importante de

différents facteurs ou encore une saturation de l'espace nucléaire par ces ARN entraînant une perturbation de fonctions indispensables à la survie des cellules. Cependant, nous avons défini une fenêtre de temps de 48 heures après le début du traitement à la doxycycline, permettant l'étude des mécanismes précoces altérés par l'expression des ARN-CUGexp dans ce modèle cellulaire.

Afin de déterminer si l'augmentation du niveau basal de ROS mesurée dans les myoblastes DM1 était liée à l'expression de la mutation, nous avons analysé ce paramètre dans ce nouveau modèle avant et après induction des ARN (CUG)_{exp}. Une augmentation de 300% du niveau de ROS est observée dès 6h d'induction, et après 24h, ce niveau est multiplié par 7 en comparaison des mêmes cellules ayant intégré la construction mais non induites (*II.2.a figure 17*). Ce résultat permet donc d'établir un lien direct entre l'expression des ARN-CUGexp et la modification du statut redox des cellules DM1. Cette augmentation brutale de la quantité de ROS pourrait également expliquer la toxicité du plasmide. En effet, la poursuite de l'augmentation du niveau de ROS dans les cellules pourrait entraîner une saturation des mécanismes permettant la régulation de ces molécules, ces dernières étant toxiques pour la cellule à partir d'une certaine quantité.

L'expression des répétitions CTG dans ce modèle inductible a également permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression des ARNm p16 après 24 heures d'induction, celle-ci étant encore plus marquée après 48 heures (*II.2.b figure 18*). L'augmentation du niveau de protéines p16 dans ces cellules, n'est détectable qu'après 48 heures de traitement à la doxycycline (*II.2.b figure 19*). Ainsi, l'augmentation de l'expression des ARNm p16 coïncide avec la modification du statut redox des cellules, induite par les ARN-CUGexp et la formation des agrégats nucléaires. Cependant, ces résultats ne suffisent pas à déterminer si l'augmentation des ROS intracellulaires est directement liée à la présence des répétitions CUG ou si ces dernières conduisent à une hypersensibilisation de la cellule face au stress. Les observations réalisées dans les conditions de culture à 3% d'O₂ semblent privilégier une hypersensibilisation des cellules mais des expériences complémentaires sont à envisager afin d'éclaircir ce point. L'utilisation d'inhibiteurs des ROS ou encore, l'emploi d'incubateur à 3% d'O₂ pourrait permettre de consolider cette hypothèse, en supprimant l'apport extérieur de molécules dérivées de l'oxygène.

Suite aux résultats montrant une régulation différentielle de la voie des MAPKinases entre des cultures primaires de myoblastes contrôles et DM1, nous avons également examiné l'activation des voies p38 et Erk 1/2 dans ce modèle inductible. Un pic transitoire d'activité

de Erk 2 a été mesuré après 6 heures d'induction (*II.2.c figure 20*), alors que seule une faible augmentation de l'activité de p38 est mesurée après 48 heures de traitement (*II.2.c figure 21*). Ces résultats indiquent donc que l'expression des ARN-CUGexp a pour conséquence une activité accrue des MAPKinases Erk dans les cellules DM1.

L'ensemble de ces résultats n'est pas suffisant pour définir le mécanisme allant de l'expression des répétitions CTG à l'activation de la sénescence répllicative via la voie p16^{INK4A}. Cependant, ce modèle nous a permis de réduire le champ d'investigation en établissant un lien direct entre l'expression d'ARN-CUGexp, la formation des agrégats et l'activation de certains acteurs des voies MAPKinase, ainsi qu'avec une perturbation du statut redox des cellules. L'étude des liens régissant l'activation précoce de la voie p16 pourrait être complétée par l'utilisation de molécules inhibitrices des ROS. Il serait ainsi possible de définir le rôle exact du statut redox de la cellule dans ces mécanismes. D'autres acteurs de la voie des MAPKinases restent également à étudier. L'emploi d'inhibiteurs spécifiques de MEK et Erk devrait permettre de définir de façon précise l'implication de ces molécules dans l'expression de p16 en cas de stress oxydatif et/ou en présence des expansions CTG. Malgré l'activation de l'expression des ARNm p16 suite à l'induction des ARN 960 CUG interrompus, nous n'avons pas pu mettre en évidence de phénomènes de sénescence dans ce modèle cellulaire du fait de la cytotoxicité de cette construction après 48 heures d'induction.

A l'instar de ce modèle cellulaire, les fibres musculaires infectées par des vecteurs AAV-CMV-960CTG, ont également présenté des signes de cytotoxicité. Nous avons observé la formation de foci dans une proportion importante de noyaux entre 2 et 6 semaines post-injection (*III.2 figure 24a*). Ces résultats ont confirmé une expression des ARN-960CUG, la formation d'agrégats ainsi que la capacité de ces derniers à séquestrer MBNL1 (*III.2 figure 24b*). De plus, au cours de cette même période, nous avons constaté une modification de l'épissage alternatif de l'ARN de Serca1 (*III.3 figure 25*). Cependant, l'analyse histologique des muscles infectés a mis en évidence la présence de différents signes caractéristiques d'une régénération massive des fibres musculaires. Ainsi, à partir de 4 semaines post-infection, la proportion de fibres centro-nucléées est dramatiquement augmentée et on observe également un pic d'expression de la Myosine néo-natale à cette même période (*III.4 figure 27*). Ces éléments sont caractéristiques d'un processus de dégénération/régénération et ne sont pas observés dans la dystrophie myotonique de type 1. L'expression du transgène contenant 960 répétitions CTG interrompues, présente donc une forte toxicité pour les fibres musculaires. Cette toxicité exclue donc la possibilité d'observer les effets des foci sur des temps longs mais pourrait éventuellement servir à l'étude des effets précoces de l'expression des grandes

répétitions CUG et de la formation des foci. Par ailleurs, le phénomène de régénération massive observé dans les muscles injectés indique que les cellules satellites qui ne sont pas infectées par les AAV-CMV-960CTG, sont capables de compenser cette dégénérescence. Cependant, dans le modèle conditionnel exprimant cette construction 960CTG (Orengo, Chambon et al. 2008), les cellules satellites exprimant également les ARN-CUG, n'arrivent pas à maintenir la masse musculaire qui s'atrophie rapidement, suggérant une dysfonction ou une altération du comportement ou devenir de ces cellules en présence des ARN-CUG.

Le comportement des cellules exprimant les ARN-(CUG)₉₆₀ diffère donc de celui des cellules possédant la mutation DM1, et ce, qu'il s'agisse de fibres musculaires *in vivo* ou de cellules isolées *in vitro*. Certains points restent donc éclaircir concernant la construction 960-CTG, notamment afin de définir les raisons de sa toxicité. En effet, malgré la présence et l'expression de grandes répétitions CTG dans les cellules DM1 (parfois supérieures à 2000 triplets CTG), les phénomènes de type apoptotiques restent minoritaires. La présence des interruptions entre les séquences de triplets CTG pourrait être à l'origine de cette toxicité mais également des différences d'activation des voies MAPKinases observées. La manipulation de séquences répétées sans interruption reste complexe, particulièrement dans le cas de grandes expansions. Néanmoins, il est envisageable d'utiliser une séquence plus courte de répétitions CTG pures afin de vérifier si des effets cytotoxiques du même type sont observés. La présence d'un promoteur fort de type CMV en amont des expansions CTG, est également susceptible de mener à un mécanisme d'apparition des foci différent de celui observé dans les cellules DM1, en mesure d'expliquer les différences obtenues entre la mutation « native » et le modèle d'expression des ARN-(CUG)_{exp}. Afin de palier à ce problème deux solutions peuvent être envisagées. La première consiste à remplacer le promoteur CMV de la construction inductible par un promoteur moins performant qui permettrait une expression moins prononcée et limiterait les effets cytotoxiques.

D'un point de vue physiologique, l'activation précoce de p16, et donc la réduction de capacité proliférative des cellules satellites, est susceptible d'entraîner d'importantes perturbations *in vivo*. La capacité des myoblastes à se répliquer, est l'un des points fondamentaux des mécanismes d'homéostasie et de régénération du muscle squelettique. Cette diminution de capacité proliférative en présence des répétitions CUG est donc susceptible de réduire les possibilités de formation ainsi que de régénération des muscles. Les myoblastes provenant de biopsies de patients DM1 sont également caractérisés par des

défauts de leurs capacités de fusion/différenciation. Une étude récente de Beaulieu D. & al. a suggéré que la perturbation des mécanismes de différenciation observée dans les cellules DM1, étaient le fait d'une production anormale de prostaglandine E2 (PGE2). Au cours de cette étude, il a été démontré que cet excès de PGE2 était notamment dû à une augmentation de l'activité de la cyclooxygénase 2 (Cox-2) (Beaulieu, Thebault et al. 2012). Or, Cox-2 est connue pour être impliquée dans certains mécanismes relatifs au stress oxydatif. En 2009, Cox-2 fut notamment décrit comme pouvant être sur-activée en présence de ROS intracellulaires dans des cellules cancéreuses (Sun, Chen et al. 2009). Les résultats obtenus au cours de notre étude, démontrant une augmentation des ROS intracellulaires parallèlement à l'expression d'ARN (CUG)₉₆₀ ainsi que dans des cellules issus de patients DM1, pourraient donc permettre une meilleure compréhension des mécanismes faisant intervenir le stress oxydatif dans la DM1 et leurs répercussions sur la fonctionnalité du muscle squelettique.

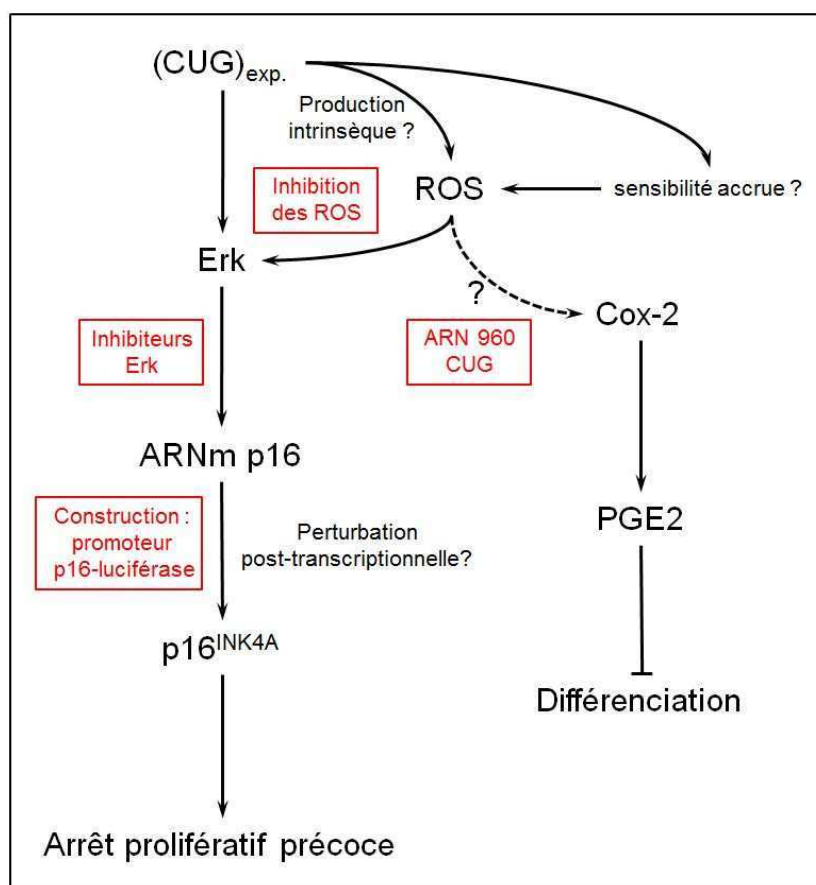


Figure 29 : Schéma récapitulatif du mécanisme d'arrêt prolifératif précoce des myoblastes DM1

Différents aspects des conséquences de la présence des expansions CTG restent à investiguer. En rouge, expériences envisageables pour finaliser l'étude.

En résumé, les travaux réalisés au cours de cette étude nous ont permis de mettre en évidence de nouvelles perturbations induites par les ARN-CUGexp et de préciser les acteurs moléculaires impliqués dans la sénescence prématurée des myoblastes DM1, ainsi que d'éliminer certains candidats parmi les acteurs des voies de signalisation. Le schéma global que l'on peut proposer actuellement est que l'expression des répétitions CTG pathologiques perturbe l'homéostasie et le statut redox des cellules DM1, et active de manière anormale la voie de signalisation des MAPKinases Erk1/2. Ces changements participent à la susceptibilité accrue des myoblastes DM1 au stress oxydatif et à l'activation prématurée de p16 dans ces cellules qui est responsable de l'arrêt réplcatif précoce des myoblastes DM1.

Conclusion & perspectives

L'objectif de cette étude était de définir le ou les mécanismes induits par les expansions de CTG dans l'activation prématurée de la voie de stress p16^{INK4A}, qui a été identifiée comme jouant un rôle clé dans l'arrêt prolifératif précoce des myoblastes DM1 *in vitro*. Les différentes analyses réalisées au cours de cette étude ont démontré l'impact du stress oxydatif sur l'activation de cette voie ainsi que sur la sénescence des cellules. La recherche des liens entre la présence des répétitions CTG, la sensibilité au stress oxydatif et l'activation précoce de la voie p16, nous a permis d'identifier le facteur Erk 1/2, appartenant à une cascade de MAPKinases, comme étant anormalement activé dans les cellules DM1 à l'état basal, mais également lors d'un stress oxydatif ou suite à l'induction d'ARN-960CUG interrompus dans des myoblastes contrôles. Malgré la toxicité à moyen terme de la construction inductible CMV-960 CTG, ce modèle reste très intéressant pour analyser les mécanismes altérés lors des temps précoces suivant l'apparition des agrégats d'ARN-CUG et nous a notamment permis de conforter le rôle des ARN-CUG dans le changement du statut redox des myoblastes DM1, mais également de valider l'implication de p68 dans la fixation de MBNL1 aux ARN-CUG.

L'analyse de la voie d'activation de p16 reste à finaliser à l'aide de ce modèle cellulaire DM1 inductible et des cultures primaires de myoblastes DM1. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des différents acteurs des voies MAPK comme le U0126 (inhibiteur de Erk et Mek), devrait permettre d'établir de façon plus précise le schéma de l'activation précoce de p16. D'autres outils, également mis en place au cours de cette étude, devraient faciliter l'analyse de la voie p16. C'est notamment le cas d'une construction permettant l'expression du gène de la luciférase sous contrôle du promoteur minimal de p16. Une fois la transduction des cellules effectuée, il sera possible de visualiser et de quantifier de façon directe l'activation de la transcription de p16 dans différentes conditions. Il est également envisageable de combiner cette approche avec le modèle d'expression induite de répétitions CTG ou encore, avec l'addition de peroxyde d'hydrogène. L'emploi d'inhibiteurs du stress oxydatif pourra aussi permettre de déterminer l'impact du stress oxydatif sur l'activation des MAPKinases et/ou de p16.

Ces différentes approches devraient permettre de définir le mécanisme moléculaire d'activation prématurée de la voie de stress p16 par les expansions CTG, mécanisme responsable de la sénescence précoce des myoblastes DM1.

Références

- Abe, J., M. Kusuhara, et al. (1996). "Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase." J Biol Chem **271**(28): 16586-16590.
- Abe, M. K., S. Kartha, et al. (1998). "Hydrogen peroxide activates extracellular signal-regulated kinase via protein kinase C, Raf-1, and MEK1." Am J Respir Cell Mol Biol **18**(4): 562-569.
- Adachi, M., M. F. Roussel, et al. (1997). "Features of macrophage differentiation induced by p19INK4d, a specific inhibitor of cyclin D-dependent kinases." Blood **90**(1): 126-137.
- Alcorta, D. A., Y. Xiong, et al. (1996). "Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13742-13747.
- Allen, R. E., C. J. Temm-Grove, et al. (1997). "Skeletal muscle satellite cell cultures." Methods Cell Biol **52**: 155-176.
- Alwazzan, M., E. Newman, et al. (1999). "Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat." Hum Mol Genet **8**(8): 1491-1497.
- Amack, J. D. and M. S. Mahadevan (2001). "The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation." Hum Mol Genet **10**(18): 1879-1887.
- Amack, J. D. and M. S. Mahadevan (2004). "Myogenic defects in myotonic dystrophy." Dev Biol **265**(2): 294-301.
- Amack, J. D., S. R. Reagan, et al. (2002). "Mutant DMPK 3'-UTR transcripts disrupt C2C12 myogenic differentiation by compromising MyoD." J Cell Biol **159**(3): 419-429.
- Armand, A. S., I. Laziz, et al. (2006). "FGF6 in myogenesis." Biochim Biophys Acta **1763**(8): 773-778.
- Atherfold, P. A., M. S. Norris, et al. (1999). "Calcium-induced ERK activation in human T lymphocytes." Mol Immunol **36**(8): 543-549.
- Baeza-Raja, B. and P. Munoz-Canoves (2004). "p38 MAPK-induced nuclear factor-kappaB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6." Mol Biol Cell **15**(4): 2013-2026.
- Balin, A. K., A. J. Fisher, et al. (1984). "Oxygen modulates growth of human cells at physiologic partial pressures." J Exp Med **160**(1): 152-166.
- Barde, I., M. A. Zanta-Boussif, et al. (2006). "Efficient control of gene expression in the hematopoietic system using a single Tet-on inducible lentiviral vector." Mol Ther **13**(2): 382-390.
- Barreau, C., S. Dutertre, et al. (2006). "Liposome-mediated RNA transfection should be used with caution." Rna **12**(10): 1790-1793.

- Barreau, C., L. Paillard, et al. (2006). "Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions." Biochimie **88**(5): 515-525.
- Barreau, C., L. Paillard, et al. (2005). "AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles?" Nucleic Acids Res **33**(22): 7138-7150.
- Barreau, C., T. Watrin, et al. (2006). "Protein expression is increased by a class III AU-rich element and tethered CUG-BP1." Biochem Biophys Res Commun **347**(3): 723-730.
- Bates, S., L. Bonetta, et al. (1994). "CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1." Oncogene **9**(1): 71-79.
- Batra, R., K. Charizanis, et al. (2010). "Partners in crime: bidirectional transcription in unstable microsatellite disease." Hum Mol Genet **19**(R1): R77-82.
- Batten, F. E. and H. P. Gibb (1909). "Two Cases of Myotonia Atrophica, showing a peculiar Distribution of Muscular Atrophy." Proc R Soc Med **2**(Neurol Sect): 32-33.
- Beaulieu, D., P. Thebault, et al. (2012). "Abnormal prostaglandin E2 production blocks myogenic differentiation in myotonic dystrophy." Neurobiol Dis **45**(1): 122-129.
- Bernheim, L. and C. R. Bader (2002). "Human myoblast differentiation: Ca(2+) channels are activated by K(+) channels." News Physiol Sci **17**: 22-26.
- Bigot, A., V. Jacquemin, et al. (2008). "Replicative aging down-regulates the myogenic regulatory factors in human myoblasts." Biol Cell **100**(3): 189-199.
- Bigot, A., A. F. Klein, et al. (2009). "Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells." Am J Pathol **174**(4): 1435-1442.
- Bladier, C., E. J. Wolvetang, et al. (1997). "Response of a primary human fibroblast cell line to H2O2: senescence-like growth arrest or apoptosis?" Cell Growth Differ **8**(5): 589-598.
- Blau, H. M. and C. Webster (1981). "Isolation and characterization of human muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(9): 5623-5627.
- Bodenez, C., V. Darrouzet, et al. (2006). "[Facial paralysis after temporal bone trauma]." Ann Otolaryngol Chir Cervicofac **123**(1): 9-16.
- Braun, T., G. Buschhausen-Denker, et al. (1989). "A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts." Embo J **8**(3): 701-709.
- Brook, J. D., M. E. McCurrach, 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 **69**(2): 385.

- Brunk, U. (1973). "Distribution and shifts of ingested marker particles in residual bodies and other lysosomes. Studies on in vitro cultivated human glia cells in phase II and 3." Exp Cell Res **79**(1): 15-27.
- Brzoska, E., V. Bello, et al. (2006). "Integrin alpha3 subunit participates in myoblast adhesion and fusion in vitro." Differentiation **74**(2-3): 105-118.
- Buckingham, M. (2007). "Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes." C R Biol **330**(6-7): 530-533.
- Buckingham, M., L. Bajard, et al. (2003). "The formation of skeletal muscle: from somite to limb." J Anat **202**(1): 59-68.
- Buj-Bello, A., D. Furling, et al. (2002). "Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells." Hum Mol Genet **11**(19): 2297-2307.
- Busciglio, J. and B. A. Yankner (1995). "Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro." Nature **378**(6559): 776-779.
- Cadet, J., T. Delatour, et al. (1999). "Hydroxyl radicals and DNA base damage." Mutat Res **424**(1-2): 9-21.
- Campisi, J. (2000). "Cancer, aging and cellular senescence." In Vivo **14**(1): 183-188.
- Canepa, E. T., M. E. Scassa, et al. (2007). "INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions." IUBMB Life **59**(7): 419-426.
- Cavanaugh, J. E., J. Ham, et al. (2001). "Differential regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and ERK5 by neurotrophins, neuronal activity, and cAMP in neurons." J Neurosci **21**(2): 434-443.
- Cayrol, C., G. Cabrolier, et al. (1997). "Use of the two-hybrid system to identify protein-protein interaction temperature-sensitive mutants: application to the CDK2/p21Cip1 interaction." Nucleic Acids Res **25**(18): 3743-3744.
- Chakravarthy, M. V., E. E. Spangenburg, et al. (2001). "Culture in low levels of oxygen enhances in vitro proliferation potential of satellite cells from old skeletal muscles." Cell Mol Life Sci **58**(8): 1150-1158.
- Chan, F. K., J. Zhang, et al. (1995). "Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4." Mol Cell Biol **15**(5): 2682-2688.
- Chang, N., J. Yi, et al. "HuR uses AUF1 as a cofactor to promote p16INK4 mRNA decay." Mol Cell Biol **30**(15): 3875-3886.
- Charge, S. B. and M. A. Rudnicki (2004). "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration." Physiol Rev **84**(1): 209-238.

- Charlet, B. N., R. S. Savkur, et al. (2002). "Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing." Mol Cell **10**(1): 45-53.
- Cheng, A., S. L. Chan, et al. (2001). "p38 MAP kinase mediates nitric oxide-induced apoptosis of neural progenitor cells." J Biol Chem **276**(46): 43320-43327.
- Cheng, M., P. Olivier, et al. (1999). "The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts." Embo J **18**(6): 1571-1583.
- Cho, D. H., C. P. Thienes, et al. (2005). "Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF." Mol Cell **20**(3): 483-489.
- Choi, J., M. L. Costa, et al. (1990). "MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(20): 7988-7992.
- Choi, S. S. and C. M. Myer, 3rd (1990). "Proliferative myositis of the mylohyoid muscle." Am J Otolaryngol **11**(3): 198-202.
- Collins, K. (2000). "Mammalian telomeres and telomerase." Curr Opin Cell Biol **12**(3): 378-383.
- Conboy, M. J., A. O. Karasov, et al. (2007). "High incidence of non-random template strand segregation and asymmetric fate determination in dividing stem cells and their progeny." PLoS Biol **5**(5): e102.
- Cong, Y. S., W. E. Wright, et al. (2002). "Human telomerase and its regulation." Microbiol Mol Biol Rev **66**(3): 407-425, table of contents.
- Cooper, R. N., S. Tajbakhsh, et al. (1999). "In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle." J Cell Sci **112** (Pt 17): 2895-2901.
- Cornelison, D. D., B. B. Olwin, et al. (2000). "MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient." Dev Biol **224**(2): 122-137.
- Cornelison, D. D. and B. J. Wold (1997). "Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells." Dev Biol **191**(2): 270-283.
- Cristofalo, V. J., P. D. Phillips, et al. (1989). "Alterations in the responsiveness of senescent cells to growth factors." J Gerontol **44**(6): 55-62.
- Cristofalo, V. J. and M. Tresini (1998). "Defects in signal transduction during replicative senescence of diploid human fibroblasts in vitro." Aging (Milano) **10**(2): 151-152.
- Cristofalo, V. J., C. Volker, et al. (1998). "Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **8**(1): 43-80.
- Csete, M., J. Walikonis, et al. (2001). "Oxygen-mediated regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and adipogenesis in culture." J Cell Physiol **189**(2): 189-196.

- Dansithong, W., S. Paul, et al. (2005). "MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1." J Biol Chem **280**(7): 5773-5780.
- Darbon, J. M., A. Devault, et al. (1994). "Cloning, expression and subcellular localization of the human homolog of p40MO15 catalytic subunit of cdk-activating kinase." Oncogene **9**(11): 3127-3138.
- Darr, K. C. and E. Schultz (1987). "Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle." J Appl Physiol **63**(5): 1816-1821.
- Dasari, A., J. N. Bartholomew, et al. (2006). "Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements." Cancer Res **66**(22): 10805-10814.
- Daughters, R. S., D. L. Tuttle, et al. (2009). "RNA gain-of-function in spinocerebellar ataxia type 8." PLoS Genet **5**(8): e1000600.
- Davis, B. M., M. E. McCurrach, et al. (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**(14): 7388-7393.
- Decary, S., C. B. Hamida, et al. (2000). "Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children." Neuromuscul Disord **10**(2): 113-120.
- Demetrick, D. J., H. Zhang, et al. (1994). "Chromosomal mapping of human CDK2, CDK4, and CDK5 cell cycle kinase genes." Cytogenet Cell Genet **66**(1): 72-74.
- Dimri, G. P., X. Lee, et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9363-9367.
- Disatnik, M. H., J. S. Chamberlain, et al. (2000). "Dystrophin mutations predict cellular susceptibility to oxidative stress." Muscle Nerve **23**(5): 784-792.
- Disatnik, M. H., J. Dhawan, et al. (1998). "Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state." J Neurol Sci **161**(1): 77-84.
- Dowdy, S. F., P. W. Hinds, et al. (1993). "Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins." Cell **73**(3): 499-511.
- Du, H., M. S. Cline, et al. (2010). "Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy." Nat Struct Mol Biol **17**(2): 187-193.
- Ducommun, B., P. Brambilla, et al. (1991). "cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin." Embo J **10**(11): 3311-3319.
- Dulic, V., E. Lees, et al. (1992). "Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase." Science **257**(5078): 1958-1961.

- Dumont, P., V. Royer, et al. (2001). "Growth kinetics rather than stress accelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblasts in oxidative stress-induced premature senescence." FEBS Lett **502**(3): 109-112.
- Duronio, R. J., A. Brook, et al. (1996). "E2F-induced S phase requires cyclin E." Genes Dev **10**(19): 2505-2513.
- Edwall, D., M. Schalling, et al. (1989). "Induction of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid during regeneration of rat skeletal muscle." Endocrinology **124**(2): 820-825.
- Endicott, J. A., P. Nurse, et al. (1994). "Mutational analysis supports a structural model for the cell cycle protein kinase p34." Protein Eng **7**(2): 243-253.
- Eriksson, M., T. Ansved, et al. (2000). "Independent regulation of the myotonic dystrophy 1 locus genes postnatally and during adult skeletal muscle regeneration." J Biol Chem **275**(26): 19964-19969.
- Ewen, M. E., H. K. Sluss, et al. (1993). "Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins." Cell **73**(3): 487-497.
- Ferrante, R. J., S. E. Browne, et al. (1997). "Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis." J Neurochem **69**(5): 2064-2074.
- Fisher, R. P. and D. O. Morgan (1994). "A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase." Cell **78**(4): 713-724.
- Foiry, L., L. Dong, et al. (2006). "Msh3 is a limiting factor in the formation of intergenerational CTG expansions in DM1 transgenic mice." Hum Genet.
- Forner, F., S. Furlan, et al. (2010). "Mass spectrometry analysis of complexes formed by myotonic dystrophy protein kinase (DMPK)." Biochim Biophys Acta **1804**(6): 1334-1341.
- Francois, V., A. F. Klein, et al. (2011). "Selective silencing of mutated mRNAs in DM1 by using modified hU7-snRNAs." Nat Struct Mol Biol **18**(1): 85-87.
- Franklin, D. S. and Y. Xiong (1996). "Induction of p18INK4c and its predominant association with CDK4 and CDK6 during myogenic differentiation." Mol Biol Cell **7**(10): 1587-1599.
- Fu, Y. H., D. L. Friedman, et al. (1993). "Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy." Science **260**(5105): 235-238.
- Fu, Y. H., A. Pizzuti, et al. (1992). "An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy." Science **255**(5049): 1256-1258.
- Fugier, C., A. F. Klein, et al. (2011). "Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy." Nat Med **17**(6): 720-725.

- Fuller-Pace, F. V. (2006). "DEXD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation." Nucleic Acids Res **34**(15): 4206-4215.
- Furling, D., L. Coiffier, et al. (2001). "Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy." Hum Mol Genet **10**(19): 2079-2087.
- Furling, D., G. Doucet, et al. (2003). "Viral vector producing antisense RNA restores myotonic dystrophy myoblast functions." Gene Ther **10**(9): 795-802.
- Furling, D., T. Lam le, et al. (2003). "Changes in myotonic dystrophy protein kinase levels and muscle development in congenital myotonic dystrophy." Am J Pathol **162**(3): 1001-1009.
- Gamou, S. and N. Shimizu (1995). "Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor." FEBS Lett **357**(2): 161-164.
- Gerland, L. M., S. Peyrol, et al. (2003). "Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging." Exp Gerontol **38**(8): 887-895.
- Goldkorn, T., N. Balaban, et al. (1998). "EGF-Receptor phosphorylation and signaling are targeted by H2O2 redox stress." Am J Respir Cell Mol Biol **19**(5): 786-798.
- Goldring, K., G. E. Jones, et al. (2002). "The effect of galectin-1 on the differentiation of fibroblasts and myoblasts in vitro." J Cell Sci **115**(Pt 2): 355-366.
- Goldstein, S. and L. B. Korczaek (1981). "Status of mitochondria in living human fibroblasts during growth and senescence in vitro: use of the laser dye rhodamine 123." J Cell Biol **91**(2 Pt 1): 392-398.
- Gomes-Pereira, M., T. A. Cooper, et al. (2011). "Myotonic dystrophy mouse models: towards rational therapy development." Trends Mol Med **17**(9): 506-517.
- Gomes-Pereira, M., L. Foiry, et al. (2007). "CTG trinucleotide repeat "big jumps": large expansions, small mice." PLoS Genet **3**(4): e52.
- Gonzalez, S. and M. Serrano (2006). "A new mechanism of inactivation of the INK4/ARF locus." Cell Cycle **5**(13): 1382-1384.
- Gourdon, G., F. Radvanyi, et al. (1997). "Moderate intergenerational and somatic instability of a 55-CTG repeat in transgenic mice." Nat Genet **15**(2): 190-192.
- Gratacos, F. M. and G. Brewer (2010). "The role of AUF1 in regulated mRNA decay." Wiley Interdiscip Rev RNA **1**(3): 457-473.
- Grifone, R., J. Demignon, et al. (2007). "Eya1 and Eya2 proteins are required for hypaxial somitic myogenesis in the mouse embryo." Dev Biol **302**(2): 602-616.
- Grifone, R., J. Demignon, et al. (2005). "Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo." Development **132**(9): 2235-2249.

- Gu, W., J. W. Schneider, et al. (1993). "Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation." Cell **72**(3): 309-324.
- Guan, K. L., C. W. Jenkins, et al. (1994). "Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function." Genes Dev **8**(24): 2939-2952.
- Guo, C. S., C. Degrin, et al. (2003). "Regulation of MyoD activity and muscle cell differentiation by MDM2, pRb, and Sp1." J Biol Chem **278**(25): 22615-22622.
- Guo, G. E., L. W. Ma, et al. (2010). "Hydrogen peroxide induces p16(INK4a) through an AUF1-dependent manner." J Cell Biochem **109**(5): 1000-1005.
- Guo, K., J. Wang, et al. (1995). "MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation." Mol Cell Biol **15**(7): 3823-3829.
- Guyton, K. Z., Y. Liu, et al. (1996). "Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury." J Biol Chem **271**(8): 4138-4142.
- Halevy, O. (1993). "p53 gene is up-regulated during skeletal muscle cell differentiation." Biochem Biophys Res Commun **192**(2): 714-719.
- Halevy, O., B. G. Novitch, et al. (1995). "Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD." Science **267**(5200): 1018-1021.
- Hannon, G. J. and D. Beach (1994). "p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest." Nature **371**(6494): 257-261.
- Harley, H. G., J. D. Brook, et al. (1992). "Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy." Nature **355**(6360): 545-546.
- Harper, P. S. (2001). The genetic basis of myotonic dystrophy. Myotonic Dystrophy. W. Saunders. London: 307-363.
- Harper, P. S., H. G. Harley, et al. (1992). "Anticipation in myotonic dystrophy: new light on an old problem." Am J Hum Genet **51**(1): 10-16.
- Hashimoto, Y., K. Kohri, et al. (1998). "Critical role for the 310 helix region of p57(Kip2) in cyclin-dependent kinase 2 inhibition and growth suppression." J Biol Chem **273**(26): 16544-16550.
- Hatakeyama, M., J. A. Brill, et al. (1994). "Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein." Genes Dev **8**(15): 1759-1771.
- Hawke, T. J. and D. J. Garry (2001). "Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology." J Appl Physiol **91**(2): 534-551.
- Haycock, J. W., S. MacNeil, et al. (1996). "Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy." Neuroreport **8**(1): 357-361.

- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res **25**: 585-621.
- He, Y., B. Vogelstein, et al. (2008). "The antisense transcriptomes of human cells." Science **322**(5909): 1855-1857.
- Hirai, H., M. F. Roussel, et al. (1995). "Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6." Mol Cell Biol **15**(5): 2672-2681.
- Hirose, T., K. Nakazato, et al. (2008). "TGF-beta1 and TNF-alpha are involved in the transcription of type I collagen alpha2 gene in soleus muscle atrophied by mechanical unloading." J Appl Physiol **104**(1): 170-177.
- Hollnagel, A., C. Grund, et al. (2002). "The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration." Mol Cell Biol **22**(13): 4760-4770.
- Holterman, C. E. and M. A. Rudnicki (2005). "Molecular regulation of satellite cell function." Semin Cell Dev Biol **16**(4-5): 575-584.
- Howe, C. J., M. M. LaHair, et al. (2002). "Participation of the calcium/calmodulin-dependent kinases in hydrogen peroxide-induced Ikappa B phosphorylation in human T lymphocytes." J Biol Chem **277**(34): 30469-30476.
- Ichijo, H., E. Nishida, et al. (1997). "Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways." Science **275**(5296): 90-94.
- Ihara, Y., A. Mori, et al. (1995). "Free radicals, lipid peroxides and antioxidants in blood of patients with myotonic dystrophy." J Neurol **242**(3): 119-122.
- Iwasa, H., J. Han, et al. (2003). "Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway." Genes Cells **8**(2): 131-144.
- Janknecht, R. (2010). "Multi-talented DEAD-box proteins and potential tumor promoters: p68 RNA helicase (DDX5) and its paralog, p72 RNA helicase (DDX17)." Am J Transl Res **2**(3): 223-234.
- Jansen, G., P. J. Groenen, et al. (1996). "Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice." Nat Genet **13**(3): 316-324.
- Javelaud, D. and F. Besancon (2002). "Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio." J Biol Chem **277**(40): 37949-37954.
- Jenkins, N. C., T. Liu, et al. (2011). "The p16(INK4A) tumor suppressor regulates cellular oxidative stress." Oncogene **30**(3): 265-274.
- Jiang, H., A. Mankodi, et al. (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**(24): 3079-3088.

- Jin, S., M. Shimizu, et al. (2000). "Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) induces actin cytoskeletal reorganization and apoptotic-like blebbing in lens cells." Cell Motil Cytoskeleton **45**(2): 133-148.
- Kalsotra, A., X. Xiao, et al. (2008). "A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(51): 20333-20338.
- Kamakura, S., T. Moriguchi, et al. (1999). "Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus." J Biol Chem **274**(37): 26563-26571.
- Kamata, H., S. Honda, et al. (2005). "Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases." Cell **120**(5): 649-661.
- Kami, K. and E. Senba (1998). "Localization of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 messenger ribonucleic acids in regenerating rat skeletal muscle." Muscle Nerve **21**(6): 819-822.
- Kanadia, R. N., K. A. Johnstone, et al. (2003). "A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy." Science **302**(5652): 1978-1980.
- Kanadia, R. N., J. Shin, et al. (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**(31): 11748-11753.
- Karin, M. and T. Hunter (1995). "Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus." Curr Biol **5**(7): 747-757.
- Karin, M., Z. Liu, et al. (1997). "AP-1 function and regulation." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 240-246.
- Karlseder, J., A. Smogorzewska, et al. (2002). "Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss." Science **295**(5564): 2446-2449.
- Karmann, K., W. Min, et al. (1996). "Activation and homologous desensitization of human endothelial cells by CD40 ligand, tumor necrosis factor, and interleukin 1." J Exp Med **184**(1): 173-182.
- Kassar-Duchossoy, L., B. Gayraud-Morel, et al. (2004). "Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice." Nature **431**(7007): 466-471.
- Kato, Y., R. I. Tapping, et al. (1998). "Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor." Nature **395**(6703): 713-716.
- Kaushal, S., J. W. Schneider, et al. (1994). "Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD." Science **266**(5188): 1236-1240.
- Kim, J. and P. K. Wong (2009). "Oxidative stress is linked to ERK1/2-p16 signaling-mediated growth defect in ATM-deficient astrocytes." J Biol Chem **284**(21): 14396-14404.

- Kimura, T., M. Nakamori, et al. (2005). "Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1." Hum Mol Genet **14**(15): 2189-2200.
- Kitzmann, M. and A. Fernandez (2001). "Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts." Cell Mol Life Sci **58**(4): 571-579.
- Klein, A. F., M. Ebihara, et al. (2008). "PABPN1 polyalanine tract deletion and long expansions modify its aggregation pattern and expression." Exp Cell Res **314**(8): 1652-1666.
- Klesert, T. R., D. H. Cho, et al. (2000). "Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy." Nat Genet **25**(1): 105-109.
- Klotz, L. O., C. Pellieux, et al. (1999). "Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA." Eur J Biochem **260**(3): 917-922.
- Koff, A., F. Cross, et al. (1991). "Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family." Cell **66**(6): 1217-1228.
- Koff, A., A. Giordano, et al. (1992). "Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle." Science **257**(5077): 1689-1694.
- Konig, S., A. Beguet, et al. (2006). "The calcineurin pathway links hyperpolarization (Kir2.1)-induced Ca²⁺ signals to human myoblast differentiation and fusion." Development **133**(16): 3107-3114.
- Konig, S., V. Hinard, et al. (2004). "Membrane hyperpolarization triggers myogenin and myocyte enhancer factor-2 expression during human myoblast differentiation." J Biol Chem **279**(27): 28187-28196.
- Korochkina, S., C. Barreau, et al. (2006). "A mosquito-specific protein family includes candidate receptors for malaria sporozoite invasion of salivary glands." Cell Microbiol **8**(1): 163-175.
- Koshelev, M., S. Sarma, et al. (2010). "Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1." Hum Mol Genet **19**(6): 1066-1075.
- Kuang, S., K. Kuroda, et al. (2007). "Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle." Cell **129**(5): 999-1010.
- Kulju, K. S. and J. M. Lehman (1995). "Increased p53 protein associated with aging in human diploid fibroblasts." Exp Cell Res **217**(2): 336-345.
- Kuyumcu-Martinez, N. M., G. S. Wang, et al. (2007). "Increased Steady-State Levels of CUGBP1 in Myotonic Dystrophy 1 Are Due to PKC-Mediated Hyperphosphorylation." Mol Cell **28**(1): 68-78.

- Kyriakis, J. M., P. Banerjee, et al. (1994). "The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases." Nature **369**(6476): 156-160.
- La Thangue, N. B. (1996). "E2F and the molecular mechanisms of early cell-cycle control." Biochem Soc Trans **24**(1): 54-59.
- Laclef, C., G. Hamard, et al. (2003). "Altered myogenesis in Six1-deficient mice." Development **130**(10): 2239-2252.
- Lal, A., H. H. Kim, et al. (2008). "p16(INK4a) translation suppressed by miR-24." PLoS One **3**(3): e1864.
- Lander, H. M. (1996). "Cellular Activation Mediated by Nitric Oxide." Methods **10**(1): 15-20.
- Lander, H. M., A. T. Jacovina, et al. (1996). "Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species." J Biol Chem **271**(33): 19705-19709.
- Langlois, M. A., N. S. Lee, et al. (2003). "Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts." Mol Ther **7**(5 Pt 1): 670-680.
- Latronico, M. V. and G. Condorelli (2010). "MicroRNAs and cardiac conduction." Curr Drug Targets **11**(8): 907-912.
- Laurent, F. X., A. Sureau, et al. (2011). "New function for the RNA helicase p68/DDX5 as a modifier of MBNL1 activity on expanded CUG repeats." Nucleic Acids Res.
- Lee, J. S., S. Y. Kim, et al. (2006). "EGFR-dependent ERK activation triggers hydrogen peroxide-induced apoptosis in OK renal epithelial cells." Arch Toxicol **80**(6): 337-346.
- Lee, K. and W. J. Esselman (2002). "Inhibition of PTPs by H₂O₂ regulates the activation of distinct MAPK pathways." Free Radic Biol Med **33**(8): 1121-1132.
- Lee, M. H., I. Reynisdottir, et al. (1995). "Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution." Genes Dev **9**(6): 639-649.
- Lee, W. C., C. H. Choi, et al. (2005). "Role of ERK in hydrogen peroxide-induced cell death of human glioma cells." Neurochem Res **30**(2): 263-270.
- Levinovitz, A., E. Jennische, et al. (1992). "Activation of insulin-like growth factor II expression during skeletal muscle regeneration in the rat: correlation with myotube formation." Mol Endocrinol **6**(8): 1227-1234.
- Lim, J. S., S. H. Park, et al. (2011). "All-trans retinoic acid induces cellular senescence by up-regulating levels of p16 and p21 via promoter hypomethylation." Biochem Biophys Res Commun **412**(3): 500-505.
- Lin, X., J. W. Miller, et al. (2006). "Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy." Hum Mol Genet **15**(13): 2087-2097.

- Lipton, B. H. and E. Schultz (1979). "Developmental fate of skeletal muscle satellite cells." Science **205**(4412): 1292-1294.
- Liu, Z. G. (2003). "Adding facets to TNF signaling. The JNK angle." Mol Cell **12**(4): 795-796.
- Lluis, F., E. Ballestar, et al. (2005). "E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription." Embo J **24**(5): 974-984.
- Lluis, F., E. Perdiguero, et al. (2006). "Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAP kinases." Trends Cell Biol **16**(1): 36-44.
- Ludolph, D. C. and S. F. Konieczny (1995). "Transcription factor families: muscling in on the myogenic program." Faseb J **9**(15): 1595-1604.
- Lukas, J., D. Parry, et al. (1995). "Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16." Nature **375**(6531): 503-506.
- Mahadevan, M., C. Tsilfidis, et al. (1992). "Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene." Science **255**(5049): 1253-1255.
- Mahadevan, M. S., R. S. Yadava, et al. (2006). "Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy." Nat Genet **38**(9): 1066-1070.
- Malumbres, M., I. Perez De Castro, et al. (2000). "Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15(INK4b)." Mol Cell Biol **20**(8): 2915-2925.
- Mankodi, A., E. Logigian, et al. (2000). "Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat." Science **289**(5485): 1769-1773.
- Marinissen, M. J., M. Chiariello, et al. (1999). "A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-jun promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5." Mol Cell Biol **19**(6): 4289-4301.
- Markesbery, W. R. (1997). "Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease." Free Radic Biol Med **23**(1): 134-147.
- Martin, G. M., S. N. Austad, et al. (1996). "Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses." Nat Genet **13**(1): 25-34.
- Mathieu, J., M. De Braekeleer, et al. (1990). "Genealogical reconstruction of myotonic dystrophy in the Saguenay-Lac-Saint-Jean area (Quebec, Canada)." Neurology **40**(5): 839-842.
- Matsuoka, S., M. C. Edwards, et al. (1995). "p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene." Genes Dev **9**(6): 650-662.
- Matsushime, H., M. E. Ewen, et al. (1992). "Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins." Cell **71**(2): 323-334.

- Matsushime, H., D. E. Quelle, et al. (1994). "D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells." *Mol Cell Biol* **14**(3): 2066-2076.
- Matynia, A., C. H. Ng, et al. (2010). "Muscleblind1, but not Dmpk or Six5, contributes to a complex phenotype of muscular and motivational deficits in mouse models of myotonic dystrophy." *PLoS One* **5**(3): e9857.
- Messina, G., C. Blasi, et al. (2005). "p27Kip1 acts downstream of N-cadherin-mediated cell adhesion to promote myogenesis beyond cell cycle regulation." *Mol Biol Cell* **16**(3): 1469-1480.
- Meyerson, M. and E. Harlow (1994). "Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner." *Mol Cell Biol* **14**(3): 2077-2086.
- Miller, J. W., C. R. Urbinati, et al. (2000). "Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy." *Embo J* **19**(17): 4439-4448.
- Minamino, T., T. Yujiri, et al. (1999). "MEKK1 suppresses oxidative stress-induced apoptosis of embryonic stem cell-derived cardiac myocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 15127-15132.
- Mocali, A., R. Caldini, et al. (1995). "Induction, effects, and quantification of sublethal oxidative stress by hydrogen peroxide on cultured human fibroblasts." *Exp Cell Res* **216**(2): 388-395.
- Modoni, A., G. Silvestri, et al. (2004). "Characterization of the pattern of cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1." *Arch Neurol* **61**(12): 1943-1947.
- Modur, V., G. A. Zimmerman, et al. (1996). "Endothelial cell inflammatory responses to tumor necrosis factor alpha. Ceramide-dependent and -independent mitogen-activated protein kinase cascades." *J Biol Chem* **271**(22): 13094-13102.
- Montarras, D., C. Lindon, et al. (2000). "Cultured myf5 null and myoD null muscle precursor cells display distinct growth defects." *Biol Cell* **92**(8-9): 565-572.
- Moore, R. and F. S. Walsh (1993). "The cell adhesion molecule M-cadherin is specifically expressed in developing and regenerating, but not denervated skeletal muscle." *Development* **117**(4): 1409-1420.
- Morse, L., D. Chen, et al. (1997). "Induction of cell cycle arrest and B cell terminal differentiation by CDK inhibitor p18(INK4c) and IL-6." *Immunity* **6**(1): 47-56.
- Moss, F. P. and C. P. Leblond (1970). "Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats." *J Cell Biol* **44**(2): 459-462.
- Moss, F. P. and C. P. Leblond (1971). "Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats." *Anat Rec* **170**(4): 421-435.
- Mouly, V., A. Aamiri, et al. (2005). "The mitotic clock in skeletal muscle regeneration, disease and cell mediated gene therapy." *Acta Physiol Scand* **184**(1): 3-15.

- Mounsey, J. P., J. E. John, 3rd, et al. (2000). "Phospholemman is a substrate for myotonic dystrophy protein kinase." *J Biol Chem* **275**(30): 23362-23367.
- Mounsey, J. P., D. J. Mistry, et al. (2000). "Skeletal muscle sodium channel gating in mice deficient in myotonic dystrophy protein kinase." *Hum Mol Genet* **9**(15): 2313-2320.
- Mulders, S. A., W. J. van den Broek, et al. (2009). "Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(33): 13915-13920.
- Muller, J., Y. Oma, et al. (2005). "Sequence and comparative genomic analysis of actin-related proteins." *Mol Biol Cell* **16**(12): 5736-5748.
- Muranyi, A., R. Zhang, et al. (2001). "Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity." *FEBS Lett* **493**(2-3): 80-84.
- Murton, A. J., D. Constantin, et al. (2008). "The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy." *Biochim Biophys Acta* **1782**(12): 730-743.
- Napierala, M. and W. J. Krzyzosiak (1997). "CUG repeats present in myotonin kinase RNA form metastable "slippery" hairpins." *J Biol Chem* **272**(49): 31079-31085.
- Noda, A., Y. Ning, et al. (1994). "Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen." *Exp Cell Res* **211**(1): 90-98.
- Novitch, B. G., G. J. Mulligan, et al. (1996). "Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle." *J Cell Biol* **135**(2): 441-456.
- Novitch, B. G., D. B. Spicer, et al. (1999). "pRb is required for MEF2-dependent gene expression as well as cell-cycle arrest during skeletal muscle differentiation." *Curr Biol* **9**(9): 449-459.
- Ohi, R. and K. L. Gould (1999). "Regulating the onset of mitosis." *Curr Opin Cell Biol* **11**(2): 267-273.
- Ohtsubo, M., A. M. Theodoras, et al. (1995). "Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2612-2624.
- Olguin, H. C. and B. B. Olwin (2004). "Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal." *Dev Biol* **275**(2): 375-388.
- Olovnikov, A. M. (1973). "A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon." *J Theor Biol* **41**(1): 181-190.
- Oma, Y., Y. Kino, et al. (2005). "Comparative analysis of the cytotoxicity of homopolymeric amino acids." *Biochim Biophys Acta* **1748**(2): 174-179.

- Orengo, J. P., P. Chambon, et al. (2008). "Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(7): 2646-2651.
- Orr, H. T. and H. Y. Zoghbi (2007). "Trinucleotide repeat disorders." Annu Rev Neurosci **30**: 575-621.
- Osborne, R. J., X. Lin, et al. (2009). "Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy." Hum Mol Genet **18**(8): 1471-1481.
- Osborne, R. J. and C. A. Thornton (2006). "RNA-dominant diseases." Hum Mol Genet **15 Spec No 2**: R162-169.
- Pardee, A. B. (1974). "A restriction point for control of normal animal cell proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(4): 1286-1290.
- Pardee, A. B. (1989). "G1 events and regulation of cell proliferation." Science **246**(4930): 603-608.
- Parker, S. B., G. Eichele, et al. (1995). "p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells." Science **267**(5200): 1024-1027.
- Passegue, E. and E. F. Wagner (2000). "JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression." Embo J **19**(12): 2969-2979.
- Pelletier, R., F. Hamel, et al. (2009). "Absence of a differentiation defect in muscle satellite cells from DM2 patients." Neurobiol Dis **36**(1): 181-190.
- Perbellini, R., S. Greco, et al. (2011). "Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1." Neuromuscul Disord **21**(2): 81-88.
- Philips, A. V., L. T. Timchenko, et al. (1998). "Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy." Science **280**(5364): 737-741.
- Pines, J. and T. Hunter (1990). "Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B." Nature **346**(6286): 760-763.
- Pines, J. and T. Hunter (1991). "Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport." J Cell Biol **115**(1): 1-17.
- Pines, J. and T. Hunter (1994). "The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B." Embo J **13**(16): 3772-3781.
- Qiao, C., T. Koo, et al. (2011). "Gene therapy in skeletal muscle mediated by adeno-associated virus vectors." Methods Mol Biol **807**: 119-140.
- Ragusa, R. J., C. K. Chow, et al. (1997). "Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy." Neuromuscul Disord **7**(6-7): 379-386.

- Rane, S. G., P. Dubus, et al. (1999). "Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia." Nat Genet **22**(1): 44-52.
- Ranum, L. P. and T. A. Cooper (2006). "RNA-mediated neuromuscular disorders." Annu Rev Neurosci **29**: 259-277.
- Ranum, L. P., P. F. Rasmussen, et al. (1998). "Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus." Nat Genet **19**(2): 196-198.
- Rau, F., F. Freyermuth, et al. (2011). "Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy." Nat Struct Mol Biol **18**(7): 840-845.
- Reddy, S., D. B. Smith, et al. (1996). "Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy." Nat Genet **13**(3): 325-335.
- Relaix, F., D. Montarras, et al. (2006). "Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells." J Cell Biol **172**(1): 91-102.
- Renault, V., L. E. Thornell, et al. (2002). "Human skeletal muscle satellite cells: aging, oxidative stress and the mitotic clock." Exp Gerontol **37**(10-11): 1229-1236.
- Resnitzky, D., M. Gossen, et al. (1994). "Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system." Mol Cell Biol **14**(3): 1669-1679.
- Reynaud, E. G., M. Guillier, et al. (2000). "Dimerization of the amino terminal domain of p57Kip2 inhibits cyclin D1-cdk4 kinase activity." Oncogene **19**(9): 1147-1152.
- Reynaud, E. G., M. P. Leibovitch, et al. (2000). "Stabilization of MyoD by direct binding to p57(Kip2)." J Biol Chem **275**(25): 18767-18776.
- Reynaud, E. G., K. Pospel, et al. (1999). "p57(Kip2) stabilizes the MyoD protein by inhibiting cyclin E-Cdk2 kinase activity in growing myoblasts." Mol Cell Biol **19**(11): 7621-7629.
- Reynisdottir, I. and J. Massague (1997). "The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2." Genes Dev **11**(4): 492-503.
- Reynisdottir, I., K. Polyak, et al. (1995). "Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta." Genes Dev **9**(15): 1831-1845.
- Ricker, K. (1999). "Myotonic dystrophy and proximal myotonic myopathy." J Neurol **246**(5): 334-338.
- Robbins, E., E. M. Levine, et al. (1970). "Morphologic changes accompanying senescence of cultured human diploid cells." J Exp Med **131**(6): 1211-1222.
- Rodriguez, M. C. and M. A. Tarnopolsky (2003). "Patients with dystrophinopathy show evidence of increased oxidative stress." Free Radic Biol Med **34**(9): 1217-1220.

- Rosenberg, A. R., F. Zindy, et al. (1995). "Overexpression of human cyclin A advances entry into S phase." Oncogene **10**(8): 1501-1509.
- Roue, G., V. Pichereau, et al. (2008). "Cyclin D1 mediates resistance to apoptosis through upregulation of molecular chaperones and consequent redistribution of cell death regulators." Oncogene **27**(36): 4909-4920.
- Rudnicki, M. A., P. N. Schnegelsberg, et al. (1993). "MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle." Cell **75**(7): 1351-1359.
- Sabourin, L. A., A. Girgis-Gabardo, et al. (1999). "Reduced differentiation potential of primary MyoD^{-/-} myogenic cells derived from adult skeletal muscle." J Cell Biol **144**(4): 631-643.
- Saitoh, M., H. Nishitoh, et al. (1998). "Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1." Embo J **17**(9): 2596-2606.
- Sarkar, B., Q. Xi, et al. (2003). "Selective degradation of AU-rich mRNAs promoted by the p37 AUF1 protein isoform." Mol Cell Biol **23**(18): 6685-6693.
- Sarkar, P. S., B. Appukuttan, et al. (2000). "Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts." Nat Genet **25**(1): 110-114.
- Savkur, R. S., A. V. Philips, et al. (2001). "Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy." Nat Genet **29**(1): 40-47.
- Schapira, A. H. (1995). "Oxidative stress in Parkinson's disease." Neuropathol Appl Neurobiol **21**(1): 3-9.
- Schieke, S. M., K. Briviba, et al. (1999). "Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation." FEBS Lett **448**(2-3): 301-303.
- Seale, P., L. A. Sabourin, et al. (2000). "Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells." Cell **102**(6): 777-786.
- Sellier, C., F. Rau, et al. (2010). "Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients." Embo J **29**(7): 1248-1261.
- Sergeant, N., B. Sablonniere, et al. (2001). "Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1." Hum Mol Genet **10**(19): 2143-2155.
- Serrano, M., G. J. Hannon, et al. (1993). "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4." Nature **366**(6456): 704-707.
- Seznec, H., O. Agbulut, et al. (2001). "Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities." Hum Mol Genet **10**(23): 2717-2726.

- Sharma, P., M. Sharma, et al. (1999). "Regulation of cyclin-dependent kinase 5 catalytic activity by phosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11156-11160.
- Sharpless, N. E. and R. A. DePinho (1999). "The INK4A/ARF locus and its two gene products." Curr Opin Genet Dev **9**(1): 22-30.
- Shay, J. W. and W. E. Wright (2000). "Hayflick, his limit, and cellular ageing." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 72-76.
- Sheaff, R. J., M. Groudine, et al. (1997). "Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1." Genes Dev **11**(11): 1464-1478.
- Sherwood, S. W., D. Rush, et al. (1988). "Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(23): 9086-9090.
- Shimizu, M., W. Wang, et al. (2000). "Rac-1 and Raf-1 kinases, components of distinct signaling pathways, activate myotonic dystrophy protein kinase." FEBS Lett **475**(3): 273-277.
- Shinin, V., B. Gayraud-Morel, et al. (2006). "Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells." Nat Cell Biol.
- Shrivastava, A. and B. B. Aggarwal (1999). "Antioxidants differentially regulate activation of nuclear factor-kappa B, activator protein-1, c-jun amino-terminal kinases, and apoptosis induced by tumor necrosis factor: evidence that JNK and NF-kappa B activation are not linked to apoptosis." Antioxid Redox Signal **1**(2): 181-191.
- Smith, J. R. (1992). "Inhibitors of DNA synthesis derived from senescent human diploid fibroblasts." Exp Gerontol **27**(4): 409-412.
- Smith, K. P., M. Byron, et al. (2007). "Defining early steps in mRNA transport: mutant mRNA in myotonic dystrophy type I is blocked at entry into SC-35 domains." J Cell Biol **178**(6): 951-964.
- Snow, M. H. (1977). "The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats." Cell Tissue Res **185**(3): 399-408.
- Snow, M. H. (1978). "An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats." Cell Tissue Res **186**(3): 535-540.
- Spalding, K. L., R. D. Bhardwaj, et al. (2005). "Retrospective birth dating of cells in humans." Cell **122**(1): 133-143.
- Spallarossa, P., P. Altieri, et al. (2010). "p38 MAPK and JNK antagonistically control senescence and cytoplasmic p16INK4A expression in doxorubicin-treated endothelial progenitor cells." PLoS One **5**(12): e15583.
- Stewart, Z. A., S. D. Leach, et al. (1999). "p21(Waf1/Cip1) inhibition of cyclin E/Cdk2 activity prevents endoreduplication after mitotic spindle disruption." Mol Cell Biol **19**(1): 205-215.

- Sun, Y., J. Chen, et al. (2009). "Chemopreventive agents induce oxidative stress in cancer cells leading to COX-2 overexpression and COX-2-independent cell death." *Carcinogenesis* **30**(1): 93-100.
- Suzaki, Y., M. Yoshizumi, et al. (2002). "Hydrogen peroxide stimulates c-Src-mediated big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) and the MEF2C signaling pathway in PC12 cells: potential role in cell survival following oxidative insults." *J Biol Chem* **277**(11): 9614-9621.
- Suzuki-Takahashi, I., M. Kitagawa, et al. (1995). "The interactions of E2F with pRB and with p107 are regulated via the phosphorylation of pRB and p107 by a cyclin-dependent kinase." *Oncogene* **10**(9): 1691-1698.
- Tahara, H., E. Sato, et al. (1995). "Increase in expression level of p21sdi1/cip1/waf1 with increasing division age in both normal and SV40-transformed human fibroblasts." *Oncogene* **10**(5): 835-840.
- Taneja, K. L., M. McCurrach, et al. (1995). "Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues." *J Cell Biol* **128**(6): 995-1002.
- Tapscott, S. J., R. L. Davis, et al. (1988). "MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts." *Science* **242**(4877): 405-411.
- Tatsumi, R., J. E. Anderson, et al. (1998). "HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells." *Dev Biol* **194**(1): 114-128.
- Teramoto, H., O. A. Coso, et al. (1996). "Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family." *J Biol Chem* **271**(44): 27225-27228.
- Thornell, L. E., M. Lindstrom, et al. (2009). "Satellite cell dysfunction contributes to the progressive muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1." *Neuropathol Appl Neurobiol* **35**(6): 603-613.
- Thornton, C. A., J. P. Wymer, et al. (1997). "Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene." *Nat Genet* **16**(4): 407-409.
- Timchenko, N. A., Z. J. Cai, et al. (2001). "RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1." *J Biol Chem* **276**(11): 7820-7826.
- Toscano, A., S. Messina, et al. (2005). "Oxidative stress in myotonic dystrophy type 1." *Free Radic Res* **39**(7): 771-776.
- Toussaint, O., E. E. Medrano, et al. (2000). "Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes." *Exp Gerontol* **35**(8): 927-945.
- Tsai, L. H., E. Lees, et al. (1993). "The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells." *Oncogene* **8**(6): 1593-1602.

- Usuki, F. and S. Ishiura (1998). "Expanded CTG repeats in myotonin protein kinase increase susceptibility to oxidative stress." Neuroreport **9**(10): 2291-2296.
- Usuki, F., N. Takahashi, et al. (2000). "Differential signaling pathways following oxidative stress in mutant myotonin protein kinase cDNA-transfected C2C12 cell lines." Biochem Biophys Res Commun **267**(3): 739-743.
- Vaccarello, G., R. Figliola, et al. (2006). "p57Kip2 is induced by MyoD through a p73-dependent pathway." J Mol Biol **356**(3): 578-588.
- Vaziri, H. and S. Benchimol (1996). "From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging." Exp Gerontol **31**(1-2): 295-301.
- Vaziri, H., M. D. West, et al. (1997). "ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase." Embo J **16**(19): 6018-6033.
- Venuti, J. M., J. H. Morris, et al. (1995). "Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development." J Cell Biol **128**(4): 563-576.
- Viallard, J. F., F. Lacombe, et al. (2001). "[Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]." Cancer Radiother **5**(2): 109-129.
- Vlach, J., S. Hennecke, et al. (1997). "Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27." Embo J **16**(17): 5334-5344.
- Wang, E. (1985). "Are cross-bridging structures involved in the bundle formation of intermediate filaments and the decrease in locomotion that accompany cell aging?" J Cell Biol **100**(5): 1466-1473.
- Wang, G. S., D. L. Kearney, et al. (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**(10): 2802-2811.
- Wang, G. S., M. N. Kuyumcu-Martinez, et al. (2009). "PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1." J Clin Invest **119**(12): 3797-3806.
- Wang, L. C., K. Y. Chen, et al. (2011). "Muscleblind participates in RNA toxicity of expanded CAG and CUG repeats in *Caenorhabditis elegans*." Cell Mol Life Sci **68**(7): 1255-1267.
- Wang, W., J. L. Martindale, et al. (2005). "Increased stability of the p16 mRNA with replicative senescence." EMBO Rep **6**(2): 158-164.
- Ward, A. J., M. Rimer, et al. (2010). "CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1." Hum Mol Genet **19**(18): 3614-3622.

- Watt, D. J., G. E. Jones, et al. (2004). "The involvement of galectin-1 in skeletal muscle determination, differentiation and regeneration." Glycoconj J **19**(7-9): 615-619.
- Weinberg, R. A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." Cell **81**(3): 323-330.
- Weintraub, H., R. Davis, et al. (1991). "The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage." Science **251**(4995): 761-766.
- Weintraub, H., S. J. Tapscott, et al. (1989). "Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(14): 5434-5438.
- Wen-Sheng, W. (2003). "ERK signaling pathway is involved in p15INK4b/p16INK4a expression and HepG2 growth inhibition triggered by TPA and Saikosaponin a." Oncogene **22**(7): 955-963.
- Wheeler, T. M., K. Sobczak, et al. (2009). "Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA." Science **325**(5938): 336-339.
- Wong, H. and K. Riabowol (1996). "Differential CDK-inhibitor gene expression in aging human diploid fibroblasts." Exp Gerontol **31**(1-2): 311-325.
- Wright, W. E. and J. W. Shay (2001). "Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting." Curr Opin Genet Dev **11**(1): 98-103.
- Yoon, S. O., C. H. Yun, et al. (2002). "Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging." Mech Ageing Dev **123**(12): 1597-1604.
- Zammit, P. S., J. P. Golding, et al. (2004). "Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?" J Cell Biol **166**(3): 347-357.
- Zammit, P. S., L. Heslop, et al. (2002). "Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers." Exp Cell Res **281**(1): 39-49.
- Zhang, J. M., Q. Wei, et al. (1999). "Coupling of the cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4." Embo J **18**(4): 926-933.
- Zhang, P., C. Wong, et al. (1999). "p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step." Genes Dev **13**(2): 213-224.
- Zhang, W., R. R. Behringer, et al. (1995). "Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies." Genes Dev **9**(11): 1388-1399.
- Zhu, C. H., V. Mouly, et al. (2007). "Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies." Ageing Cell **6**(4): 515-523.

- Zhuang, S., J. T. Demirs, et al. (2000). "p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide." J Biol Chem **275**(34): 25939-25948.
- Zhuang, S. and R. G. Schnellmann (2004). "H₂O₂-induced transactivation of EGF receptor requires Src and mediates ERK1/2, but not Akt, activation in renal cells." Am J Physiol Renal Physiol **286**(5): F858-865.
- Zindy, F., D. E. Quelle, et al. (1997). "Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging." Oncogene **15**(2): 203-211.
- Zu, T., B. Gibbens, et al. (2010). "Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(1): 260-265.

Annexes

Article 1: Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells.

Bigot A, Klein AF, Gasnier E, Jacquemin V, Ravassard P, Butler-Browne G, Moully V, Furling D.
Am J Pathol. 2009 Apr;174(4):1435-42. Epub 2009 Feb 26.

Article 2: Gain of RNA function in pathological cases: Focus on myotonic dystrophy.

Klein AF, Gasnier E, Furling D.
Biochimie. 2011 Nov;93(11):2006-12. Epub 2011 Jul 13.

Article 3: New function for the RNA helicase p68/DDX5 as a modifier of MBNL1 activity on expanded CUG repeats.

Laurent FX, Sureau A, Klein AF, Trouslard F, Gasnier E, Furling D, Marie J.
Nucleic Acids Res. 2011 Dec 9. [Epub ahead of print]

Musculoskeletal Pathology

Large CTG Repeats Trigger p16-Dependent Premature Senescence in Myotonic Dystrophy Type 1 Muscle Precursor Cells

Anne Bigot,^{*†} Arnaud F. Klein,^{*†} Erwan Gasnier,^{*†} Virginie Jacquemin,^{*†} Philippe Ravassard,[‡] Gillian Butler-Browne,^{*†} Vincent Mouly,^{*†} and Denis Furling^{*†}

From the Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris 6, UMRS 787 and 974,* and INSERM, U787 and 974,[†] Institut de Myologie, Paris, France; and the CNRS and UPMC, LGN UMR 7091,[‡] Paris, France

A CTG repeat amplification is responsible for the dominantly inherited neuromuscular disorder, myotonic dystrophy type 1 (DM1), which is characterized by progressive muscle wasting and weakness. The expanded (CTG)_n tract not only alters the myogenic differentiation of the DM1 muscle precursor cells but also reduces their proliferative capacity. In this report, we show that these muscle precursor cells containing large CTG expansion sequences have not exhausted their proliferative capacity, but have entered into premature senescence. We demonstrate that an abnormal accumulation of p16 is responsible for this defect because the abolition of p16 activity overcomes early growth arrest and restores an extended proliferative capacity. Our results suggest that the accelerated telomere shortening measured in DM1 cells does not contribute to the aberrant induction of p16. We propose that a cellular stress related to the amplified CTG repeat promotes premature senescence mediated by a p16-dependent pathway in DM1 muscle precursor cells. This mechanism is responsible for the reduced proliferative capacity of the DM1 muscle precursor cells and could participate in both the impaired regeneration and atrophy observed in the DM1 muscles containing large CTG expansions. (Am J Pathol 2009, 174:000–000; DOI: 10.2353/ajpath.2009.080560)

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is the most prevalent form of adult neuromuscular disorder, characterized by myotonia, muscle wasting, and weakness as well as other multisystemic defects.¹ DM1 is an autosomal dominant

disease caused by the expansion of a CTG repeat in the 3' untranslated region (3'UTR) of the *DMPK* gene.^{2–5} Unaffected individuals have fewer than 38 CTG repeats whereas DM1 patients have from 100 to several thousand repeats in the most severe cases. In general, the size of the expansion correlates with the age of onset and the severity of the disease.^{6,7} An increasing amount of evidence supports a RNA gain-of-function mechanism in DM1 disease. The mutant transcripts containing the CUG expansion fold into RNA hairpins that are not exported to the cytoplasm but accumulate in the nuclei as discrete foci. These mutant RNAs interfere with the activities of proteins involved in RNA processing such as MBNL, CUG-BP1, hnRNP H, leading to specific misregulated splicing events.⁸ As an example, the misregulation of alternative splicing of the chloride channel *ClC-1* mRNAs found in DM1 patients has been directly linked to myotonia, a characteristic feature of the disease.⁹

The CTG mutation is very unstable and its amplification occurs both over generations and in somatic tissues. Intergenerational instability of the expanded microsatellite provides the molecular basis for the anticipation phenomenon described in DM1 disease: the size of the CTG expansion progressively increases in successive generations of DM1 families, and correlates with the severity of the disease.¹ After several generations, the patients often develop the severe DM1 congenital form associated with a large CTG expansion (>1000) and characterized by delayed muscle maturation and atrophy. Somatic instability is also measured throughout the life of a DM1 patient with a gradual increase in the average repeat size. Moreover, variable repeat sizes are detected in different tissues of the same patient with the largest size being found in the skeletal muscle.^{10,11} In a previous study, we

Supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), University Paris 6, Institut National de la santé et de la recherche médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and MYOAMP (grants EC, FP6, 037479).

Accepted for publication December 29, 2008.

Address reprint requests to Dr. Denis Furling, UPMC-Paris VI/Inserm/CNRS, UMRS 974, 105 Blvd de l' Hôpital, Paris, 75013, France. E-mail: denis.furling@upmc.fr.

have shown that the size of the CTG expansion increases progressively at each cellular division during the proliferative lifespan of DM1 muscle precursor cells, also called satellite cells *in vivo* or myoblasts in culture, indicating a replication-dependent somatic instability of the expanded microsatellite.¹² In addition to myogenic differentiation defects, we showed that the proliferative capacity of the satellite cells isolated from congenital DM1 patients with large CTG repeats was significantly reduced as compared with age-matched controls.

The proliferative capacity of human satellite cells, like the majority of human diploid somatic cells, is limited by cellular senescence. One major mechanism implicated in the replicative senescence of human cells is the progressive erosion of their telomeres at each cell division. Once a critically short telomere length is reached, replicative senescence is triggered through a p53-dependent pathway.¹³ The introduction of the catalytic subunit of the telomerase (hTERT) gene into human fibroblasts is sufficient to block telomere shortening and prevent replicative senescence in these cells, and lead to their immortalization.¹⁴ However, expression of hTERT is not sufficient to confer immortality to several types of human cells including satellite cells, indicating the existence of cell-type-specific differences in the regulation of the proliferative capacity.¹⁵ The p16-dependent pathway has been shown to provoke proliferative arrest before telomeres reach their critical value, and inhibition of p16 in addition to hTERT activity results in the immortalization of keratinocytes, epithelial cells, and satellite cells.^{16,17} p16 is up-regulated in response to several telomere-independent stress mechanisms including DNA damage, oncogenic signals, and oxidative stress,¹⁸ but has also been proposed to be involved in response to telomere damage.¹⁹ Recently several reports have indicated that an increase in p16 expression in the brain, bone marrow, and pancreas progenitor cells during aging contributes to stem cell decline, senescence, and aging.²⁰

In this report, we have analyzed the premature growth arrest of DM1 satellite cells carrying large CTG expansions. Our results indicate that a mechanism of premature senescence limits the proliferative capacity of the DM1 satellite cells. We demonstrate that the p16 pathway is responsible for this premature growth arrest in response to a CTG-related stress. In addition our results indicate that the accelerated telomere shortening measured in DM1 cells is not involved in the early accumulation of p16 but is rather a consequence of the cellular stress induced by the CTG mutation.

Materials and Methods

Materials and Cell Culture

The human satellite cells were isolated from muscle biopsies obtained from the Bank of Tissues for Research (a partner in the European Union network EuroBioBank) in accordance with European recommendations and French legislation. Three DM1 fetuses (28-, 34-, and 37-weeks old) showing clinical symptoms of the congenital

form with varus feet, arthrogryposis, muscular hypotrophy, and carrying more than 2000 CTG were included in this study. Three individuals (2 fetuses of 29 and 37 weeks of age, and one 5-day-old infant) showing no sign of neuromuscular disease were used as controls. The muscle biopsies were finely minced and explants were plated onto noncoated Petri dishes in drops of fetal calf serum (Invitrogen, Carlsbad, CA). The cells were cultivated at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO₂. Once mononucleated cells had migrated out from the explants, growth medium consisting of Ham's F10 medium (Invitrogen) supplemented with 20% fetal calf serum and 5 µg/ml gentamicin was added. At the time of cell isolation, all cell populations were considered to be at 1 mean population doubling. Cell populations were trypsinized when they reached 80% of confluence. At each passage, the number of divisions was calculated according to the formula: $\log(N/n)/\log 2$ where N is the number of cells counted and n is the number of cells initially plated. The cultures were considered to be in an irreversible growth arrest when they failed to divide during 3 weeks in proliferative conditions. Viability was controlled by trypan blue (Sigma, St. Louis, MO) exclusion. The myogenic purity of the populations was monitored by immunocytochemistry using desmin as a marker because it is only expressed in myogenic cells. All cell populations used in this study had a myogenic purity greater than 75%. For 5-aza-2'-deoxycytidine experiment, cells were treated with 3 µmol/L 5-aza-2'-deoxycytidine (Sigma) for 7 days as described by Darbro and colleagues.²¹

Cell Transduction

hTERT and Cdk4 cDNA were cloned into distinct pBABE retroviral vectors containing, respectively, the puromycin selection marker and a neomycin resistance gene. Transduced cell cultures were submitted to selection in the presence of puromycin (0.5 µg/ml) and/or neomycin (0.3 mg/ml) for 10 days.

Immunocytochemistry

For bromodeoxyuridine (BrdU) labeling, cell cultures were grown for 72 hours in the presence of 10 µg/ml BrdU and then fixed for 10 minutes with ethanol. Cells that had incorporated BrdU were detected using the monoclonal antibody Bu20a (DAKO, Glostrup, Denmark), revealed by a specific secondary antibody directly coupled to Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR). DAPI (Calbiochem, San Diego, CA) was used to visualize the nuclei. All images were digitalized using the MetaView image analysis system (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA). To determine the percentage of positive cells, at least 500 cells were counted. The expression of desmin was revealed using the antibody D33 (1/50, DAKO) and specific antibody binding was revealed with peroxidase (Vectastain; Vector Laboratories, Burlingame, CA). SA-β-galactosidase activity was revealed as described by Dimri and colleagues.²²

Telomere Length Analysis

Two μg of genomic DNA were digested with Hinf1 (Bio-labs, Santa Ana, CA) to generate telomere restriction fragments. The samples were resolved by electrophoresis in a 0.7% agarose gel that was hybridized to a ^{32}P - $(\text{TAGGG})_4$ probe. The signal responses were revealed using the Personal-Molecular-Imager (Bio-Rad, Hercules, CA) and analyzed by a computer-assisted system using National Institutes of Health (Bethesda, MD) Image 1.62 and ProFit software. The mean of telomere lengths was determined from three independent gels.

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Two μg of total RNA isolated using Trizol (Invitrogen) were reverse-transcribed into cDNA according to the manufacturer's instructions. Equal amounts of the reverse transcription products were subjected to PCR amplification (ABGene, Rochester, NY). Amplification was initiated by 4 minutes of denaturation at 94°C , followed by 20 (GAPDH) or 35 cycles (p16) of amplification. Each cycle consists of 60 seconds at 94°C , 60 seconds at 55°C (GAPDH), or 62°C (p16) and 60 seconds at 72°C . A final step of extension was performed for 10 minutes at 72°C . After amplification, $15\ \mu\text{l}$ of each PCR reaction product were separated on a 1% agarose gel containing ethidium bromide. The following primers, synthesized by Sigma-Proligo were used: GAPDH, forward, 5'-GATGACAAGCTTC-CCGTTCTCAGCC-3'; GAPDH, reverse, 5'TGAAG-GTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3'; p16, forward, 5'-TGGAGCCTTCGGCTGACTGGCTGGC-3'; and p16, reverse, 5'-CTACGAAAGCGGGGTGGGTTGT-3'.

Western Blotting

Thirty μg of total protein extracts were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and incubated with different antibodies directed against Rb (Pharmingen, San Diego, CA), p16 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), p53 (Santa Cruz Biotechnology), cyclin D (Cell Signaling, Beverly, MA) and Emerin (Novocastra, Newcastle, UK). Secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase were revealed using the ECL kit (Pierce, Rockford, IL). The signal was detected on film (Fuji Film, Fuji, Tokyo, Japan) and quantified by densitometry.

Statistical Analysis

Prism software was used to calculate the statistical significance and the SEM. Significance was tested by Student's unpaired *t*-test or Mann-Whitney test. For all tests, the groups were considered statistically different for *P* value <0.05 (**P* <0.05 , ***P* <0.01 , ****P* <0.001).

Results

Premature Senescence of DM1 Satellite Cells

The proliferative capacity of satellite cells isolated from muscles of three congenital DM1 patients with large CTG repeats (>2000) was compared *in vitro* to that of satellite cells isolated from three age-matched and nonaffected individuals. The cells were grown under identical culture conditions until they ceased to respond to mitogenic stimuli for 3 weeks and entered into an irreversible cell-cycle arrest. As shown in Figure 1A, the average proliferative lifespan of the DM1 satellite cells was significantly reduced by 40% as compared with that of control cells. When they stopped dividing both DM1 and control satellite cells displayed a flattened and enlarged morphology characteristic of senescent cells (Figure 1B). Senescent-associated β -galactosidase activity was detected in growth-arrested DM1 cells, as well as high levels of cyclin D1, which is a reliable marker of replicative senescence and was detected in both DM1 and control cells at the end of their lifespan (Figure 1C). Analysis of the phosphorylation status of Rb showed that arrested DM1 and control satellite cells contained only the hypophosphorylated form, in contrast to the proliferating cells at earlier passages, which expressed in addition the hyperphosphorylated form essential to overcome the G_1 checkpoint (Figure 1D). Cell-cycle fluorescence-activated cell sorting analysis confirmed that the majority of DM1 and control cells were arrested in G_1 (data not shown). These results indicate that a mechanism similar to senescence is responsible for the early proliferative growth arrest of DM1 satellite cells because these cells expressed biomarkers usually observed in senescent cells, although much earlier in their replicative lifespan as compared with control cultures.

To evaluate if the premature growth arrest observed in satellite cells isolated from DM1 patients was attributable to an excessive proliferation *in vivo* before their isolation, we measured the size of the telomeres in these cells. Telomere length represents a predictive marker of the regenerative capacity of the human satellite cells as shown in Duchenne muscular dystrophy in which the extensive proliferation of the satellite cells after continuous cycles of degeneration and regeneration leads to reduced telomere length.²³ As shown in Figure 1E, DM1 satellite cells stop dividing with telomeres significantly longer than those of control cells (respectively, 8.7 kb versus 7.4 kb), indicating that telomeres of DM1 cells had not reached their critical size and consequently that these cells had not exhausted their proliferative capacity. This confirms that a mechanism of premature senescence alters and limits *in vitro* the replicative lifespan of DM1 satellite cells carrying large CTG expansions.

p16 Triggers Premature Senescence in DM1 Cells

As demonstrated recently, the p16 cyclin-dependent kinase inhibitor is a key regulator of the replicative senescence of human satellite cells.¹⁷ To determine whether the p16/Rb pathway is involved in the premature senescence of DM1 cells *in vitro*, we have measured the ex-

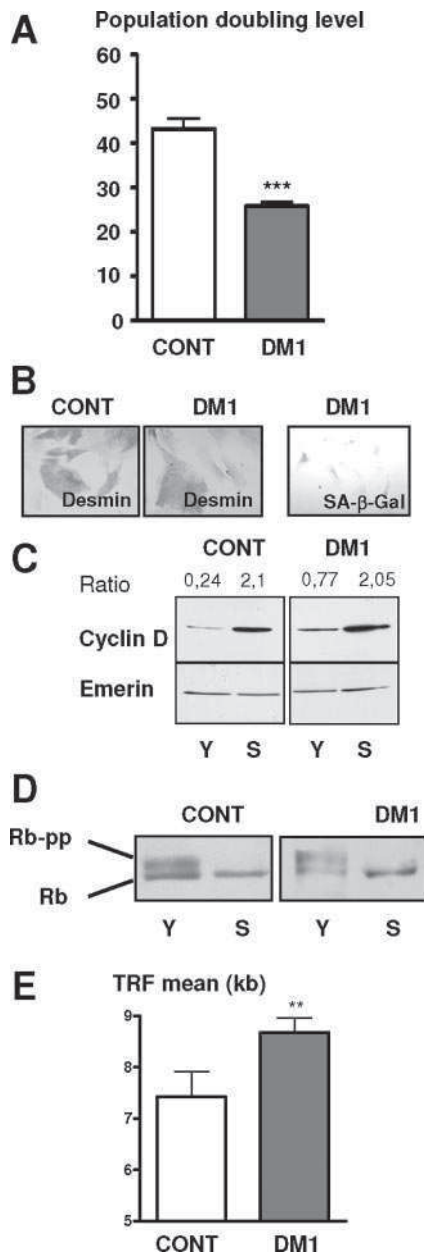


Figure 1. DM1 satellite cells stop dividing by a premature senescence pathway. **A:** Mean of the population doubling level of DM1 and control satellite cells isolated from muscles of three DM1 patients with large CTG repeats (>2000) and three age-matched and nonaffected individuals, respectively. **B:** Immunocytochemistry using anti-desmin antibody and revealed by peroxidase was performed on senescent control and premature growth-arrested DM1 cells. Flattened and enlarged morphologies are present in both arrested DM1 cells and control senescent cells. Senescent-associated β-galactosidase activity (SA-β-Gal) was observed on arrested DM1 cells. **C:** Western blot analyses of cyclin D in the early (Y) and late (S) stages of their proliferative lifespan. The results were normalized to the expression of the nuclear protein Emerin. Levels of cyclin D were increased in both DM1- and control-arrested cells. **D:** Western blot analyses of Rb in the early (Y) and late (S) stages of their proliferative lifespan. The hyperphosphorylated form of Rb is absent in both controls and DM1-arrested cells. **E:** Mean length of telomeric restriction fragments (TRFs) measured on DM1 and control satellite cells at proliferative arrest. DM1 satellite cells stop dividing with longer telomeres than controls. (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

pression of p16 protein at the end of their lifespan. In these experiments we found that a similar level of p16 was detected in both DM1 and control cultures once they had entered proliferative arrest (Figure 2A). Moreover, it

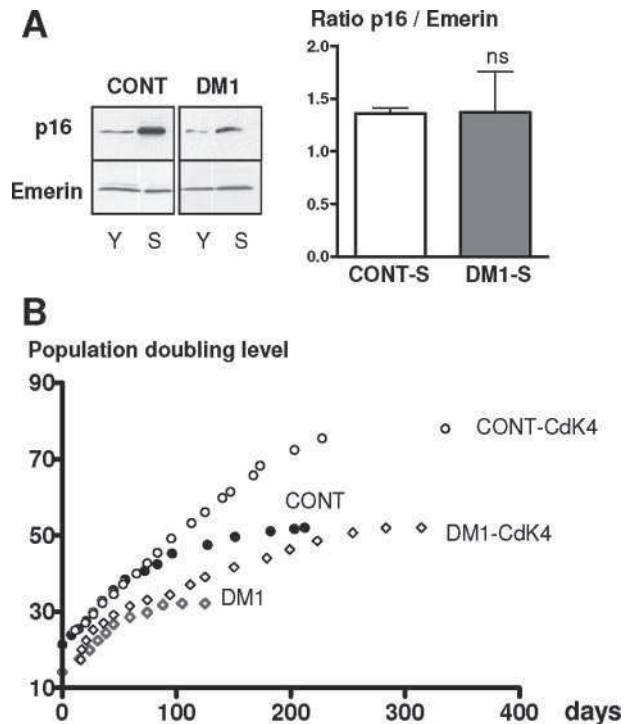


Figure 2. Premature growth arrest of DM1 satellite cells is dependent on the p16 pathway. **A:** p16 levels in control and DM1 satellite cells at early (Y) and late (S) stages in their proliferative lifespan were determined by Western blot. Means of the p16/Emerin ratio in control and DM1 senescent cells were presented on the histogram. Control- and DM1-arrested cells present the same level of expression of p16. **B:** Lifespan plots of control and DM1 populations transduced with or without Cdk4. Transduction of Cdk4 gene allows to bypass the arrest observed in nontransduced cells.

should be noted that DM1 cells made significantly fewer divisions than control cells (Figure 2B). The accumulated p16 will bind Cdk4 thus inhibiting its activity and block cell-cycle progression. To assess the role of p16 in DM1 premature senescence, we stably overexpressed Cdk4 to neutralize p16 activity. As seen in Figure 2B, DM1-Cdk4 cells were able to bypass the premature growth arrest observed in DM1 cells. Their lifespan was extended by 59% to 51 divisions, which is very close to the 52 divisions observed in control cells. In addition, overexpression of p16 in young control cells resulted in a premature proliferative arrest, as evidenced by absence of BrdU incorporation after incubation for 72 hours (data not shown). These results demonstrate that p16 is responsible for triggering *in vitro* the premature senescence of DM1 satellite cells.

However, we also abolished p16 activity by overexpression of Cdk4 in control cells and observed that the DM1-Cdk4 cells still make fewer divisions than the control-Cdk4 age-matched cells (51 versus 70 divisions, respectively) before entering into replicative senescence (Figure 2B). To assess if a residual activity of p16 could be responsible for the proliferative arrest of the Cdk4-overexpressing cells, RNA interference directed to p16 was induced in these cells, but no further expansion of their lifespan was observed (data not shown). Measurements of telomere lengths showed that DM1-Cdk4 and control-Cdk4 satellite cells both stop growing with telo-

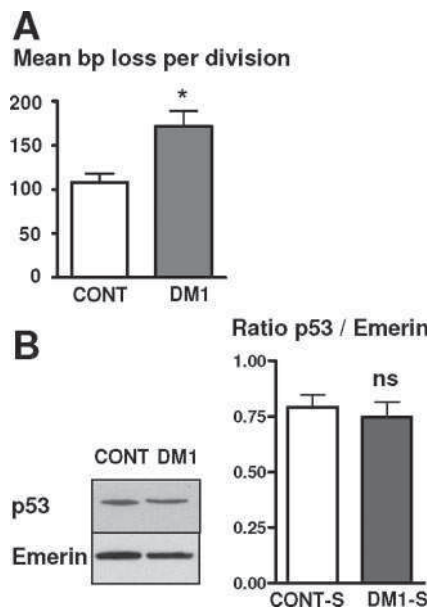


Figure 3. Deregulation of the telomere homeostasis in DM1 satellite cells. **A:** Mean length of telomeric DNA in bp lost per division in cultures of control and DM1 satellite cells. DM1 cells lost more bp per division than control cells. **B:** Western blot analyses of the level of p53 in control and DM1 satellite cells at the end of their lifespan. Means of the p53/Emerin ratio in control- and DM1-arrested cells are presented on the histogram. (* $P < 0.05$).

mere lengths of 6.2 kb and 6.1 kb, respectively. These values are almost identical to the 6 kb measured in senescent human fibroblasts in which a telomere-dependent senescence is induced by short telomeres. Both the DM1- and control Cdk4-transduced cells stopped growing with short telomeres but the DM1-Cdk4 cells reached this minimum value after fewer divisions than the control-Cdk4 cells, suggesting that large CTG expansions may interfere with the telomere homeostasis machinery in DM1 cells.

CTG Repeat Expansion Alters Telomere Homeostasis in DM1 Cells Independently from p16 Induction

Telomere loss per division was calculated from measurements made at several time points during the lifespan of DM1 and control cells, and a significant 59% increase in the amount of telomeric DNA lost per division was measured in DM1 satellite cell cultures (171.9 ± 17 bp) as compared with control cultures (108.1 ± 10 bp) (Figure 3A). To determine whether or not the increase in the amount of telomeric DNA lost per division in DM1 satellite cells was a consequence of an increased cell death in DM1 cultures, which would result in an increase in the number of divisions made by the surviving cells and thus in an increase in mean telomere shortening, we assessed both cell death and proliferation in control and DM1 populations. No significant difference was observed in the number of proliferating cells, as demonstrated by BrdU incorporation in the middle of their lifespan: $77 \pm 3\%$ cells in control populations versus $75 \pm 4\%$ cells in DM1

populations were BrdU-positive, indicating that both populations have similar growth rates. Viability of the cells was assessed by trypan blue exclusion, and only very low levels of cell death were detected in both cultures ($3.7 \pm 0.8\%$ in control and $4.6 \pm 1\%$ in DM1 cultures), with no significant difference being observed between them. These results confirm that the higher rate of telomere loss in DM1 cells is not a consequence of an increased cell death, which would result in an increase number of divisions made by the surviving cells. To determine whether a higher rate of telomere shortening may induce elevated levels of p53 and thus participate to the premature proliferative arrest, p53 protein levels were measured by Western blot in DM1 cells presenting a higher rate of telomere loss and control cells, both at the end of their lifespan. A similar level of p53 was detected in both cultures (Figure 3B), indicating that an elevation in the level of expression of p53 is not triggered by increased telomere loss.

The increased loss of telomeric DNA per division will reduce the number of divisions that DM1 cells can make before reaching telomere-driven senescence and explains why the critical telomere size of 6 kb is reached by the DM1-Cdk4 cells after having made fewer divisions than control-Cdk4 cells. To determine whether such an accelerated telomere loss could act as a signal or could be responsible for the premature senescence of the DM1 cells, we expressed the catalytic subunit of telomerase hTERT because the activity of this enzyme should compensate for the increased telomere erosion. As seen in Figure 4A, DM1 cells expressing hTERT were not able to make more divisions than DM1 cells before entering into premature growth arrest suggesting that the higher rate of telomere erosion may not contribute to the process of premature senescence observed *in vitro* in DM1 satellite cells. However, among these arrested cells, a clone of proliferating cells emerged after 2 months of culture (Figure 4B), which overcame the arrested population (Figure 4B, lane S) and presented an abolition of p16 expression, as demonstrated by the decline in the level of p16 detected at two successive time points (Figure 4, B and C, lanes 1 and 2) in culture. The promoter region of the p16 gene contains a 5'CpG island that has been found to exhibit increased levels of methylation in various tumors as well as in telomerase immortalized human keratinocytes.²¹ The abolition of p16 expression in this clone was confirmed at the RNA level and a re-expression of p16 was measured when these cells were treated with 5-aza-2' deoxycytidine (Figure 4D, lane 2*). This result indicates that methylation of the p16 promoter had occurred in this DM1-hTERT clone, leading to its immortalization because these cells have now made more than 200 divisions. Immortalization of the DM1 satellite cells was also obtained by the dual overexpression of hTERT and Cdk4, and these cells have been maintained for more than 150 divisions (Figure 4E). Measurement of the telomere lengths showed that the expression of hTERT in DM1-Cdk4 satellite cells stabilized the telomere length to ~ 10 kb, a value similar to that observed in control hTERT/Cdk4-cells (Figure 4E, inset). We conclude that blocking

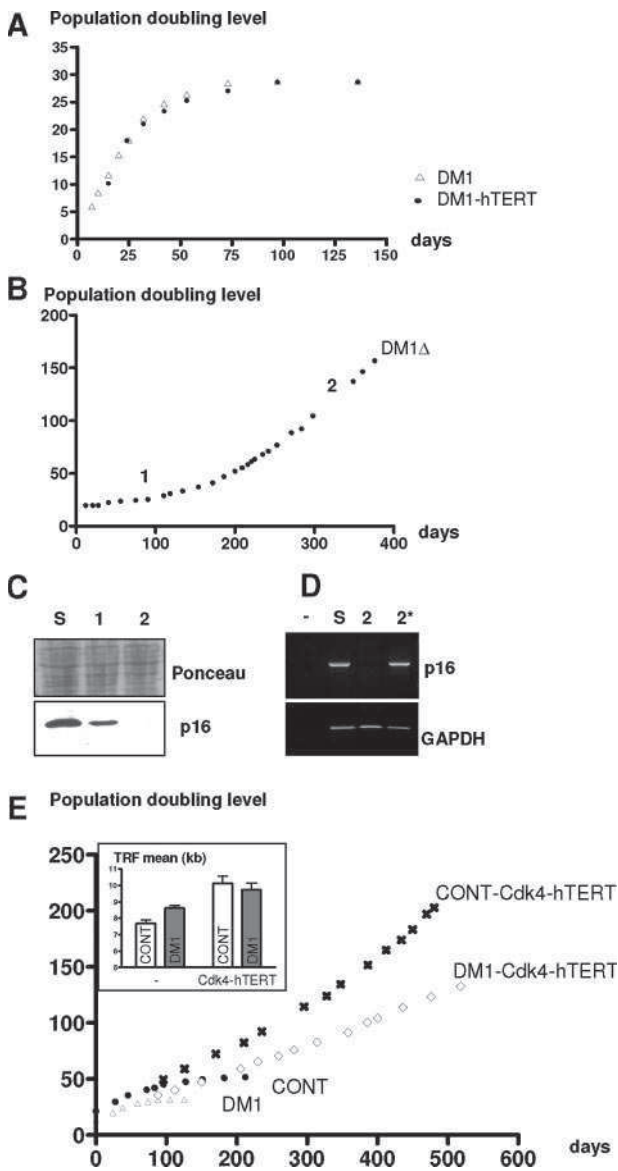


Figure 4. Immortalization of DM1 satellite cells. **A:** Lifespan plots of DM1 satellite cells transduced with or without hTERT. hTERT-transduced cells were not able to bypass the premature arrest observed in DM1 satellite cells. **B:** Lifespan plot of a clone of cells (DM1 Δ) that emerged from a DM1 satellite cell population transduced with hTERT. DM1 Δ cells were immortalized. **C:** Western blot analyses of p16 in senescent DM1 cells (**lane S**), in the senescent population with emerging DM1 Δ cells (**lane 1**), and in the DM1 Δ after several divisions (**lane 2**). The two points (1 and 2) are also indicated on the DM1 Δ lifespan curve shown above. **D:** Expression of p16 and GAPDH mRNA analyzed by RT-PCR: negative control (**lane -**), senescent DM1 satellite cells (**lane S**), DM1 Δ (**lane 2**), DM1 Δ treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (**lane 2***). **E:** Lifespan plots of DM1 satellite cells transduced with or without Cdk4 and hTERT. Cdk4- and hTERT-transduced DM1 cells were immortalized. Effect of hTERT on the telomere length is presented in the **inset**. hTERT stabilized the telomere length of the cells \sim 10 kb.

both the p16 and the telomere pathways leads to the immortalization of DM1 satellite cells.

Discussion

In this report, we provide new evidence that large CTG expansions trigger *in vitro* a mechanism of premature senescence through a p16-dependent pathway, which

reduces significantly the proliferative capacity of DM1 muscle precursor cells. Measurements of telomere lengths at the end of their lifespan indicate that DM1 cells had not exhausted their proliferative capacity confirming that a premature growth arrest, independent from an excessive *in vivo* turnover, occurred in satellite cells isolated from DM1 biopsies. Analysis of several biomarkers suggests that a mechanism similar to cellular senescence is responsible for the premature and irreversible cell-cycle arrest of DM1 muscle precursor cells containing large CTG expansions. Our data demonstrated that the Rb regulator p16 triggers *in vitro* this premature senescence because abolition of p16 activity in DM1 satellite cells reverses their precocious growth arrest and restores their proliferative capacity.

The Rb regulator p16, appears to be an important cellular sensor of stasis in response to various stresses such as DNA damage, oxidative stress, and telomere dysfunction.^{18,24} Even if an alteration of the telomere homeostasis, reflected by the accelerated telomere shortening, is measured in DM1 cells, the re-introduction of telomerase activity in these cells fails to extend their proliferative lifespan. Although the higher rate of telomere loss in DM1 cells may not participate to the triggering of the signal for p16 activation, as suggested by the absence of effect of the transduction by telomerase, we cannot exclude that other elements involved in telomere dysfunction could interfere with the p16 pathway. The signaling involved in the premature senescence of DM1 cells appears to be independent from the telomere-driven senescence pathway because i) the DM1 satellite cells stop dividing with telomeres significantly longer than those of control cells; ii) abolition of the dominant and irreversible p16 barrier in DM1 satellite cells prevents their premature senescence and extends their lifespan; and iii) the DM1 cells with inactive p16 stop dividing and enter into senescence with critically short telomeres of 6 kb through a telomere-dependent mechanism, like the human fibroblasts.

However, the question as to how the CTG mutation interferes with telomere homeostasis remains to be solved. The expanded CTG repeat is unstable and we have shown, in a previous study, that the size of the CTG repeat increases during the lifespan of the DM1 satellite cells.¹² The amplified CTG expansion adopts several unusual structures that disturb DNA metabolism and require the involvement of the DNA repair machinery.²⁵ Because proteins involved in the regulation of telomere homeostasis could also participate to the DNA damage response,²⁶ the possibility that the large CTG expanded repeats may participate to accelerated telomere shortening in DM1 cells, eg, by modifying activities or by titrating such dual proteins, is still open. It should also be noted that accelerated telomere shortening has been associated with higher oxidative stress.^{27,28} Interestingly, increased levels of free radicals and lipid peroxidation have also been measured in DM1 patients suggesting that oxidative stress could be involved in the disease progression of DM1.²⁹ In addition, the cellular susceptibility to oxidative stress was positively correlated with the number of CTG repeats.³⁰ In the present study, a 59% increase in the amount of telomeric DNA lost per division

was measured *in vitro* in DM1 cells when compared with control cells, although both control and DM1 cells were grown under identical culture conditions. Although results observed *in vitro* cannot be directly applied to the *in vivo* situation in adult DM1 patients, an increased susceptibility to reactive oxygen species of DM1 cells carrying large CTG as well as the potential implication of oxidative stress in the increased telomere loss measured in DM1 cells deserve further investigation.

Our study has revealed a new and novel feature of the DM1 mutation: the large CTG and/or CUG expansions trigger *in vitro* stress-signaling events, which are responsible for the early activation of p16 and subsequently, the premature senescence of DM1 satellite cells. Numerous noxious stresses including reactive oxygen species and DNA-damaging stimuli have been reported to induce p16 both *in vitro* and *in vivo*, and the induction of p16 in response to various stresses is a slow process that takes several weeks.¹⁸ Interestingly, an inappropriate activation of PKCs by a large CUG repeat RNA that causes hyperphosphorylation and stabilization of CUGBP1 was demonstrated in DM1.³¹ PKCs are stress-sensing kinases that can also be activated by several types of physiological and oxidative stresses^{32,33} suggesting a potential role for the nuclear aggregates of mutant mRNA with CUG expansions as a primary event in this stress-signaling cascade. The pathway involved in the abnormal activation of p16 in DM1 satellite cells has not yet been defined, however the consequences for these muscle precursors cells result *in vitro* in their premature senescence and replicative arrest. Recently, p16 was shown to contribute to the decline in the number of stem cells during aging and consequently, to the reduced tissue regenerative capacities.^{34–36} We propose that expanded CTG repeats may also interfere and activate the p16 senescence pathway in muscle precursor cells *in vivo*. Interestingly, a premature senescence has also been observed in satellite cells isolated from severely DM1-affected adults (unpublished data). The physiological role of the myogenic precursor cells is to maintain the muscle mass and repair skeletal muscle. After injury or damage, the quiescent satellite cells located under the basal lamina of muscle fibers are activated, proliferate, differentiate, and fuse to form newly regenerated fibers or be incorporated into growing fibers. A proliferation step is required to amplify the number of myogenic precursor cells that will regenerate the damaged fibers and a decrease in their number attributable to a reduced proliferative capacity could limit both the regenerative capacity and the nuclear turnover of muscle fibers in DM1. If confirmed *in vivo*, the premature senescence of the DM1 satellite cells would most probably result in the slowing down or alteration of the regenerative process or the maintenance of muscle mass because the differentiation program of senescent myogenic precursor cells is defective as characterized by impaired myogenesis and down-regulation of the myogenic regulatory factors.³⁷ Interestingly, it was suggested that abnormal regeneration could be involved in the myopathic appearance of the muscle fibers in DM1.³⁸ More recently, a report suggests that in DM1 muscle fibers containing sarcoplasmic masses, a

characteristic feature of DM1 disease, the myogenic differentiation program is interrupted at a late stage leading to incomplete maturation of these fibers.³⁹ p16 as well as other cell-cycle regulators have been detected in the DM1 fibers containing these sarcoplasmic masses supporting the implication of the p16 pathway in the lack of regeneration observed in DM1. Altogether our results suggest that the large CTG mutation induces *in vitro* a p16-dependent premature senescence of the DM1 satellite cells resulting in an important reduction in their proliferative capacity when compared with the entire proliferative lifespan of normal satellite cells. The premature senescence of the DM1 myogenic precursor cells caused by the CTG expansion, if confirmed *in vivo*, could alter the mechanism of muscle mass maintenance and participate to the muscular atrophy that takes place in DM1.

Acknowledgments

We thank Woodring Wright and Geron Corporation for the kind gifts of cdk-4 and hTERT vectors; Rob Hoeben and Françoise Carlotti for p16 vector; the Human Cell Culture Platform of The Myology Institute; and Alban Vignaud, Kamel Mamchaoui, Lidia Dollé, Virginie François, Stéphane Vasseur, and Maud Chapart for technical support.

References

1. Harper PS: Myotonic Dystrophy, ed 3. London, W.B. Saunders, 2004
2. Aslanidis C, Jansen G, Amemiya C, Shuttler G, Mahadevan M, Tsilifidis C, Chen C, Alleman J, Wormskamp NG, Vooijs M, Buxton J, Johnson K, Smeets JM, Lennon G, Carrano AV, Korneluk R, Wieringa B, de Jong P: Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect. *Nature* 1992, 355:548–551
3. Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, Hudson T, Sohn R, Zemelman B, Snell RG, Rundle SA, Crow S, Davies J, Shelbourne P, Buxton J, Jones C, Juvonen V, Johnson K, Harper P, Shaw DJ, Housman D: 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* 1992, 68:799–808
4. Fu YH, Pizzuti A, Fenwick Jr RG, King J, Rajnarayan S, Dunne PW, Dubel J, Nasser GA, Ashizawa T, de Jong P, Wieringa B, Korneluk R, Peryman MB, Epstein HF, Caskey CT: An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 1992, 255:1256–1258
5. Mahadevan M, Tsilifidis C, Sabourin L, Shuttler G, Amemiya C, Jansen G, Neville C, Narang M, Barcelo J, O'Hoy K, Leblond S, Earl-Macdonald J, de Jong P, Wieringa B, Korneluk R: Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 1992, 255:1253–1255
6. Hunter A, Tsilifidis C, Mettler G, Jacob P, Mahadevan M, Surh L, Korneluk R: The correlation of age of onset with CTG trinucleotide repeat amplification in myotonic dystrophy. *J Med Genet* 1992, 29:774–779
7. Tsilifidis C, MacKenzie AE, Mettler G, Barcelo J, Korneluk RG: Correlation between CTG trinucleotide repeat length and frequency of severe congenital myotonic dystrophy. *Nat Genet* 1992, 1:192–195
8. Paul S, Dansithong W, Kim D, Rossi J, Webster NJ, Comai L, Reddy S: Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *EMBO J* 2006, 25:4271–4283
9. Mankodi A, Takahashi MP, Jiang H, Beck CL, Bowers WJ, Moxley RT, Cannon SC, Thornton CA: Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell* 2002, 10:35–44

10. Anvret M, Ahlberg G, Grandell U, Hedberg B, Johnson K, Edstrom L: Larger expansions of the CTG repeat in muscle compared with lymphocytes from patients with myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 1993, 2:1397-1400
11. Thornton CA, Johnson K, Moxley III RT: Myotonic dystrophy patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes. *Ann Neurol* 1994, 35:104-107
12. Furling D, Coiffier L, Mouly V, Barbet JP, St Guily JL, Taneja K, Gourdon G, Junien C, Butler-Browne GS: Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 2001, 10:2079-2087
13. Vaziri H, West MD, Allsopp RC, Davison TS, Wu YS, Arrowsmith CH, Poirier GG, Benchimol S: ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO J* 1997, 16:6018-6033
14. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE: Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998, 279:349-352
15. Di Donna S, Mamchaoui K, Cooper RN, Seigneurin-Venin S, Tremblay J, Butler-Browne GS, Mouly V: Telomerase can extend the proliferative capacity of human myoblasts, but does not lead to their immortalization. *Mol Cancer Res* 2003, 1:643-653
16. Ramirez RD, Herbert BS, Vaughan MB, Zou Y, Gandia K, Morales CP, Wright WE, Shay JW: Bypass of telomere-dependent replicative senescence (M1) upon overexpression of Cdk4 in normal human epithelial cells. *Oncogene* 2003, 22:433-444
17. Zhu CH, Mouly V, Cooper RN, Mamchaoui K, Bigot A, Shay JW, Di Santo JP, Butler-Browne GS, Wright WE: Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell* 2007, 6:515-523
18. Kim WY, Sharpless NE: The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 2006, 127:265-275
19. Jacobs JJ, de Lange T: Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr Biol* 2004, 14:2302-2308
20. Campisi J, d'Adda di Fagagna F: Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8:729-740
21. Darbro BW, Lee KM, Nguyen NK, Domann FE, Klingelutz AJ: Methylation of the p16(INK4a) promoter region in telomerase immortalized human keratinocytes co-cultured with feeder cells. *Oncogene* 2006, 25:7421-7433
22. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:9363-9367
23. Decary S, Hamida CB, Mouly V, Barbet JP, Hentati F, Butler-Browne GS: Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscul Disord* 2000, 10:113-120
24. Robles SJ, Adami GR: Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 1998, 16:1113-1123
25. Pearson CE, Nichol Edamura K, Cleary JD: Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet* 2005, 6:729-742
26. Longhese MP: DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres. *Genes Dev* 2008, 22:125-140
27. von Zglinicki T: Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002, 27:339-344
28. Oikawa S, Kawanishi S: Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett* 1999, 453:365-368
29. Toscano A, Messina S, Campo GM, Di Leo R, Musumeci O, Rodolico C, Aguenouz M, Annesi G, Messina C, Vita G: Oxidative stress in myotonic dystrophy type 1. *Free Radic Res* 2005, 39:771-776
30. Usuki F, Ishiura S: Expanded CTG repeats in myotonin protein kinase increase susceptibility to oxidative stress. *Neuroreport* 1998, 9:2291-2296
31. Kuyumcu-Martinez NM, Wang GS, Cooper TA: Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell* 2007, 28:68-78
32. Gopalakrishna R, Jaken S: Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000, 28:1349-1361
33. Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U, Nishizuka Y: Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:11233-11237
34. Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, Sharpless NE: p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* 2006, 443:453-457
35. Janzen V, Forkert R, Fleming HE, Saito Y, Waring MT, Dombkowski DM, Cheng T, DePinho RA, Sharpless NE, Scadden DT: Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* 2006, 443:421-426
36. Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J, Sharpless NE, Morrison SJ: Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* 2006, 443:448-452
37. Bigot A, Jacquemin V, Debacq-Chainiaux F, Butler-Browne GS, Toussaint O, Furling D, Mouly V: Replicative aging down-regulates the myogenic regulatory factors in human myoblasts. *Biol Cell* 2008, 100:189-199
38. Borg J, Edstrom L, Butler-Browne GS, Thornell LE: Muscle fibre type composition, motoneuron firing properties, axonal conduction velocity and refractory period for foot extensor motor units in dystrophia myotonica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987, 50:1036-1044
39. Vattemi G, Tomelleri G, Filosto M, Savio C, Rizzuto N, Tonin P: Expression of late myogenic differentiation markers in sarcoplasmic masses of patients with myotonic dystrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005, 31:45-52



Mini-review

Gain of RNA function in pathological cases: Focus on myotonic dystrophy

A.F. Klein^{a,b,c,d}, E. Gasnier^{a,b,c,d}, D. Furling^{a,b,c,d,*}^aUPMC Univ Paris 06, UM 76, F-75013 Paris, France^bINSERM, UMR_S974, F-75013 Paris, France^cCNRS, UMR 7215, F-75013 Paris, France^dInstitut de Myologie, F-75013 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2011

Accepted 23 June 2011

Available online 13 July 2011

Keywords:

Myotonic dystrophy

Pathogenic RNA

Expanded repeats in non-coding region

RNA gain-of-function

Nuclear RNA aggregates

ABSTRACT

Expansion of repeated sequences in non-coding regions of different genes causes a number of inherited diseases including myotonic dystrophies, Huntington disease-like 2, Fragile X tremor/ataxia syndrome and spinocerebellar ataxia 8, 10, 12, 31. Involvement of an RNA gain-of-function mechanism in pathological case has been described and studied in-depth in myotonic dystrophy type 1 (DM1). This inherited neuromuscular disorder is caused by a (CTG)_n >50 expansion in the 3' non-coding region of the dystrophin myotonia-protein kinase (*DMPK*) gene. Expanded CUG transcripts (CUGexp-RNAs) are sequestered in the nucleus within small aggregates and interfere with the regulatory splicing activities of MBNL1 and CELF1 RNA-binding proteins, leading to the misregulation of the alternative splicing of several transcripts. Despite the relevance of aberrant splicing events in this complex pathology, the CUGexp-RNAs trans-dominant effects alter other splicing-independent processes that may also contribute to DM1 pathogenesis. This review will focus on toxic RNA gain-of-function as a pathologic mechanism for DM1 and other repeat expansion disorders.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Over the last decade, toxic RNA gain-of-function has emerged as a new pathogenic mechanism, essentially for diseases caused by expanded repeat sequences. The molecular pathology of repeat expansion disorders is complex and other mechanisms have been shown to contribute to their pathogenesis. For example, repeat expansions in protein-coding regions give rise to homopolymeric stretches such as a polyglutamine tract in Huntington disease (HD) or a polyalanine tract in oculopharyngeal muscular dystrophy. Such homopolymeric stretches alter the normal function of the proteins and are often associated with the formation of abnormal protein aggregates, which interfere with cellular homeostasis [1]. On the other hand, repeat expansions in non-coding regions result in transcriptional silencing and loss of the protein products: expansion of (GAA)_n in the 5' untranslated region (UTR) of the *FXN* gene and (CGG)_n in the first intron of the *FMR1* gene cause the autosomal recessive form of Friedrich's ataxia and the X-linked fragile X syndrome, respectively. However until recently, no protein-mediated mechanism was associated with myotonic dystrophies

type 1 and 2, Huntington disease-like 2 (HDL2), spinocerebellar ataxia (SCA8, 10, 12 and 31) or fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS), a group of inherited disorders with repeat expansions in non-coding regions (see Table 1). A mechanism of RNA gain-of-function due to the expression of pathogenic RNA with expanded repeats has been established in the case of the myotonic dystrophy type 1 (DM1). This review will focus on the pathophysiological mechanisms involved in DM1, a neuromuscular disease that belongs to the new family of RNA-mediated disorders.

2. Myotonic dystrophy type 1: a RNA-mediated disease

2.1. Dominant inherited disorder

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) also called Steinert disease (MIM#160900) is one of the most common muscular dystrophies encountered in adults. Progressive muscle wasting and weakness, myotonia, cardiac conduction defects, alteration in cognitive functions as well as several other multisystemic symptoms characterize this dominantly inherited disease [2]. DM1 is a complex disease caused by an expanding (CTG)_n repeat of 50 to several thousand triplets in the 3'UTR of the dystrophin myotonia-protein kinase (*DMPK*) gene on chromosome 19 [3,4]. Unaffected individuals have less than 38 repeats. The size of the expansion is generally

* Corresponding author. UPMC Univ Paris 06, UM 76, F-75013 Paris, France. Tel.: +33 1 42 16 57 16.

E-mail address: denis.furling@upmc.fr (D. Furling).

Table 1
Disorders with a presumed toxic RNA gain-of-function mechanism.

Symbol	Disease	Expanded repeat of	Location of the expansion	Number of repeat in non-affected allele	Number of repeat in pathogenic allele	Formation of RNA foci	Splicing misregulation	Ref
DM1	Myotonic Dystrophy type 1	CTG	3'UTR of DMPK	5–37	50–>4000	Yes	Yes	[3]
DM2	Myotonic Dystrophy type 2	CCTG	Intron 1 of ZNF9	10–26	100–11000	Yes	Yes	[17]
FXTAS	Fragile X tremor/ataxia syndrome	CGG	5'UTR of FMR1	20–45	55–200	Yes	Yes	[69,70]
HDL2	Huntington Disease-like 2	CTG/CAG	3'UTR of JPH3	6–28	>41–59	Yes	Unknown	[71,72]
SCA8	Spinocerebellar Ataxia 8	CTG	3'UTR of ATXN8OS	15–91	100–197	Yes	Yes	[73]
SCA10	Spinocerebellar Ataxia 10	ATTCT	Intron 9 of ATXN10	10–29	400–4500	Unknown	Unknown	[74,75]
SCA12	Spinocerebellar Ataxia 12	CAG	Promoter/upstream region of PPP2R2B	7–32	51–78	Unknown	Unknown	[76]
SCA31	Spinocerebellar Ataxia 31	TAGAA/TAAAA/ TGGAA	Intron of BEAN	0	>100	Yes	Unknown	[77]

correlated with the clinical severity and the age of onset of the disease [5–7]. Due to the variable clinical symptoms, several forms of the disease (asymptomatic late-onset, mild adult-onset, childhood-onset and congenital) have been described. The severe congenital form is associated with large expansions (over 1500 CTG repeats), and affected patients have motor and mental retardation. The disease-associated repeat expansion is very unstable and the number of triplets increases across generations providing a molecular basis for the anticipation phenomenon observed in DM1 families [8,9]. In addition to intergenerational instability, CTG repeat expansion is also unstable in somatic tissues throughout the lifetime of the patient.

2.2. RNA gain-of-function mechanism

The DM1 mutation was identified in 1992 as a CTG expansion in the 3' non-coding region of the *DMPK* gene, and evidences for an RNA gain-of-function mechanism in pathogenesis came to light progressively. Both wild-type and mutant *DMPK* alleles are transcribed into mRNAs but mutant transcripts with expanded CUG repeats (CUGexp-RNAs) are sequestered in the nucleus as discrete aggregates or foci leading to decrease cytoplasmic *DMPK* mRNA levels [10,11]. Subsequent reduction of *DMPK* protein levels has been a subject of controversy but reduced *DMPK* levels were observed in muscle samples from DM1 patients as well as DM1 muscle cells [12–15]. Possible involvement of *DMPK* haploinsufficiency in DM1 pathophysiology as well as reduced levels of *SIX5* due to the *SIX homeobox 5* (*SIX5*) gene location directly downstream from the DM1 locus, were first investigated by generating mouse models. However heterozygous *Dmpk* or *Six5* knockout mice failed to reproduce DM1-like symptoms suggesting that *DMPK* or *SIX5* haploinsufficiency are probably not responsible for the DM1 phenotype [16–19].

Afterward it has been suggested that the mutant transcripts from the expanded *DMPK* allele were pathogenic per se. Animal models were developed to investigate the role and the deleterious effects of CUGexp-RNA expression. Transgenic mice that expressed CUG repeat expansion either in the 3'UTR of the human skeletal muscle alpha actin (HSA-LR) mRNA [20] or in its natural context within the 3'UTR of the human *DMPK* transcript [21], exhibited several DM1 features including nuclear aggregates of CUGexp-RNA, myotonia discharges and muscle abnormalities. In addition, severe muscle wasting was described in an inducible EpA960/HSA-Cre-ER transgenic mice expressing 960 interrupted CTG repeats within the context of the *DMPK* exon 15 [22] and progressive muscle atrophy was observed in mice expressing human *DMPK* mRNA with 550 CUG repeats [23]. Altogether, these studies provided strong experimental supports for a key role of CUGexp-RNAs in DM1 pathogenesis. The last evidence for an RNA gain-of-function mechanism came from the identification of a myotonic dystrophy

type 2 disorder (DM2; MIM#602668) that shares similar clinical features with DM1 disease suggesting a common molecular mechanism. DM2 is caused by a (CCTG)_n repeat expansion ranging from 100 to 11,000 units in the first intron of the *CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein* (*CNBP* also known as *ZNF9*) gene, a non-coding region from a gene non-related to *DMPK* [24]. The RNAs containing the expanded CCUG repeats are also retained in the nucleus and formed aggregates providing an additional support for a central role of mutant RNAs containing expanded repeats in pathophysiology of both DM1 and DM2 diseases.

2.3. Nuclear RNA aggregates

The CUGexp-RNAs are not exported into the cytoplasm but are retained in the nuclear compartment as discrete aggregates or foci that are easily detected by FISH [11]. The mutant *DMPK* mRNAs are spliced and polyadenylated but their nuclear sequestration due to expanded CUG repeats in the 3'UTR, prevents any translation [10]. Within the nuclei, the foci of CUGexp-RNAs are localized at the periphery of the nuclear speckles, which are structures enriched in splicing snRNPs and the spliceosome assembly factor SC35 as well as many other transcription and splicing-related factors [25]. The pathogenic *DMPK* transcripts do not enter into the speckles [26] suggesting that their export is blocked at an early step in nucleoplasmic transport. *In vitro* studies including crystal structure, enzymatic mapping, optical melting and electron microscopy, have demonstrated that expanded CUG repeats are able to form stable hairpin structures [27–30]. These double-stranded structures are defined by Watson–Crick G–C base-pairs separated by a periodic U–U mismatch. The muscleblind-like 1 (MBNL1) proteins were found to bind these expanded CUG repeats and to colocalize with nuclear foci of CUGexp-RNAs in DM1 cells [28]. MBNL1 silencing by RNA interference significantly reduces the number of foci and restores the capacity of these pathogenic transcripts to progress through the nuclear speckles [26] indicating that the binding of MBNL1 to the abnormal CUG repeats may promote nuclear foci formation [26,28,31]. It should be noted that MBNL1 also colocalizes with the nuclear foci of CCUG expanded RNA in DM2 cells however the DM2 foci are not localized at the periphery of the nuclear speckles as observed for the DM1 foci [25]. Besides the difference within the expanded nucleotide repeat (CUG vs. CCUG) between DM1 and DM2, the entrapped RNAs in DM2 may contain intronic expanded CCUG repeats only since the *CNBP* pre-mRNA seems to be normally spliced [32] and/or expanded CCUG repeats into abnormally spliced *CNBP* transcripts [33]. Finally, nuclear retention of the CUGexp-RNAs participates to the pathogenic mechanism since the nuclear export of artificial CUGexp-RNAs by inclusion of woodchuck post-transcriptional regulatory element reduces cellular defects [34] and the production of DM1 foci exclusively in the cytoplasmic compartment does not induce key DM1 features in a mouse model [35].

2.4. Additional toxic RNA species

It has been shown that transcription can occur in both sense and antisense directions at the DM1 locus [36]. Based on genome wide evaluations achieved on non-expanded alleles, the copy level of the sense *DMPK* transcripts is higher than the corresponding antisense transcripts [37,38]. However the regulation of the bi-directional transcription in DM1 context is not fully characterized, and the effect of the expanded repeats on antisense transcription and expression is not well defined yet. Nevertheless, antisense transcripts containing expanded CAG repeats could be expressed in DM1 cells concomitantly to CUGexp-RNAs. As reported for CAG expansion disorders, the CAGexp-RNAs are able to form nuclear foci and to colocalize with MBNL1 [39,40]. Moreover, expression of long tract of untranslated CAG repeats was shown to induce toxicity at the RNA level and can cause deleterious effects in animal models [41]. In another hand, it has been proposed that the expression of expanded CAG repeats may enhance the toxicity of CTG repeats in a DM1 *Drosophila* model through a triplet repeat-derived siRNA mechanism [42]. A previous report has suggested that expanded CUG repeats alone can also be processed into small RNAs that activate an RNA interference pathway to silence specific targets and increase toxicity [43]. Finally, recent findings have demonstrated that both sense and antisense transcripts expressed from the CTG.CAG expansion mutation, are subject to non-ATG initiated translation (RAN-translation). This mechanism causes the production of proteins with long homopolymeric amino acid tracts such as polyalanine, polyglutamine and poly-leucine tracts [44]. Expression of these proteins could lead to the formation of aggregates and are usually associated with cellular toxicity [45–47]. Detection of rare but reproducible polyglutamine-containing aggregates in DM1 tissues and animal models [44] suggest that in addition to the well-described RNA gain-of-function mechanism, a protein-mediated toxicity could also be involved in DM1 pathogenesis. Consequences of bi-directional transcription at the DM1

locus are not fully understood yet but should be taken into consideration.

3. Trans-dominant effects of pathogenic RNA

3.1. Misregulation of alternative splicing

At the molecular level, one of the best-characterized trans-dominant effects induced by the CUGexp-RNAs in DM1 is the misregulation of alternative splicing of a subset of pre-mRNAs. To date, more than twenty transcripts have been found to be mis-spliced in different tissues of DM1 patients [48]. The misregulation of splicing events in DM1 is distinct from aberrant splicing caused by mutations in regulatory splicing sites that lead to the expression of aberrant mRNA. In DM1, mis-splicing events result from an inappropriate regulation of alternative splicing due to altered activities of splicing regulators such as MBNL1 and CELF1 (Fig. 1). These two factors are developmental regulators of splicing events especially during the fetal to adult transition, and the modification of their activities in DM1 tissues leads to the expression of a fetal splicing pattern in adult tissues [49,50]. It should be noted that altered expression of splicing factors and alternative splicing changes may also occurred during active regeneration process in degenerative muscle diseases [51]. However no massive degeneration/regeneration was observed in DM1 muscles [52] and altered splicing events were found in non-regenerating tissue such as DM1 cardiac tissue [53,54] confirming that misregulation of alternative splicing in DM1 is more likely a primary response to the expression of CUGexp-RNAs rather than a secondary effect to robust degeneration/regeneration process.

The first splicing misregulation described in DM1 cardiac muscle was the abnormal inclusion of exon 5 in *cTNT* [53]. Since then, several other transcripts with inappropriate splicing patterns have been identified in both skeletal muscle and brain including

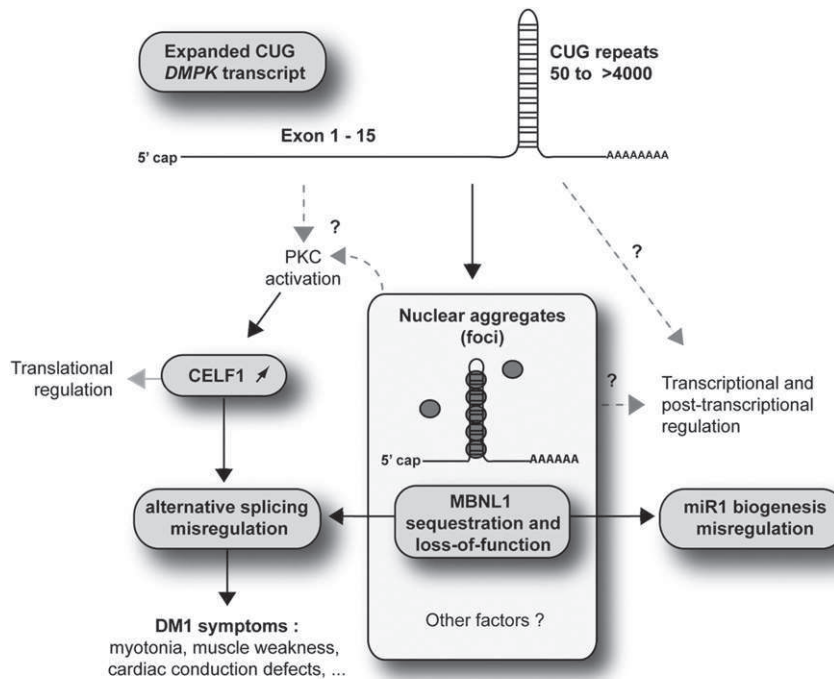


Fig. 1. Mechanisms of the RNA gain-of-function in DM1. Expansion of CUG repeats in the *DMPK* transcripts results in the nuclear retention of the CUGexp-RNAs, which form nuclear aggregates or foci. CUGexp-RNAs alters functions of MBNL1 and CELF1 RNA-binding proteins: MBNL1 sequestration into the foci leading to MBNL1 loss-of-function and gain of CELF1 activity due to its nuclear increase/stabilization through PKC mediated hyperphosphorylation. These alterations cause a trans-dominant effect depicted by misregulation of alternative splicing of specific transcripts. CUGexp-RNA may also interfere with other process at transcriptional, post-transcriptional and translational levels.

those coding for the insulin receptor (IR) [55], the muscle specific chloride channel (CLC-1) [56,57], the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1 and 2, the ryanodine receptor [58], the myotubularin-related protein 1 [59], the tau protein [60] and the N-methyl-alpha-aspartate receptor [61]. Among the known mis-splicing events, most of them may participate to the pathologic process but very few have been directly correlated with disease symptoms. One of the exceptions is the *CLC-1* splicing defect, which has been associated with myotonia, a characteristic feature of the disease. This splicing misregulation leads to the inclusion of exon 7a and subsequently to a truncated CLC-1 protein that is devoid of channel activity and is not correctly addressed to the membrane of the muscle fibers, resulting in reduced muscle chloride conductance and myotonia [56,57]. Correction of this sole splicing defect in HSA-LR mice resulted in the rescue of the myotonic phenotype [62]. More recently, the newly identified *BIN1* splicing defect has been associated with muscle weakness, another hallmark of DM1. *BIN1* is implicated in the biogenesis and maintenance of the muscle T-tubules, which are specialized skeletal muscle membrane structures essential for excitation–contraction (E–C). Misregulation of *BIN1* splicing leads to the exclusion of the exon 11 and subsequently to a *BIN1* protein with reduced PtdIns5P binding and membrane tubulation capacities, which results in disorganized T-tubules, altered E–C coupling and ultimately, muscle weakness [63].

3.2. Alteration of *MBNL1* and *CELF1* splicing regulatory activities

As mentioned previously, the *MBNL1* RNA-binding protein has been shown to bind, in a length-dependant manner, CUGexp-RNA with high affinity and form ribonucleoprotein complexes [28]. *MBNL1* is part of a conserved MBNL family including *MBNL1*, 2, 3, and all members contain four CCCH zinc-finger protein domains that are structured in pairs and acted as RNA-binding domains [64]. Sequestration of *MBNL1* within the nuclear aggregates of CUGexp-RNAs and the subsequent involvement of *MBNL1* loss-of-function in DM1 pathogenesis has been supported by the generation of a knockout *Mbnl1* mouse model that demonstrates a DM-like phenotype as well as alternative splicing misregulation [65]. Moreover a majority of the modifications in alternative splicing observed in the HSA-LR mice expressing CUGexp-RNA can be attributed to the loss-of-function of the *MBNL1* splicing factor [66,67]. In addition, mis-splicing events observed in this DM1 mouse model as well as myotonia can be reversed by *MBNL1* overexpression in skeletal muscles [68]. Several reports have demonstrated the regulatory splicing function of *MBNL1* on several DM1 transcripts such as *CLC-1*, *BIN1*, *CTNT* or *IR*. Now, it is established that *MBNL1* loss-of-function due to its sequestration by the CUGexp-RNA contributes to the “spliceopathy” in DM1.

CELF1 (also known as CUGBP1) is another RNA-binding protein involved in this process. This factor is a member of the CELF family that contains 6 proteins with high homology [69]. Interestingly, *CELF1* and *MBNL1* are antagonistic regulators of many splicing events that are mis-regulated in DM1. *CELF1* is able to bind single-strand CUG repeats but does not colocalize with the nuclear aggregates of CUGexp-RNA in DM1 cells and is not sequestered like *MBNL1* [70]. In contrast the level of *CELF1* is increased in DM1 tissues leading to a gain of *CELF1* activity. It has been shown that the expression of CUGexp-RNA results in hyperphosphorylation and stabilization of the *CELF1* protein through an inappropriate activation of the Protein Kinase C (PKC) [71,72]. The pathogenic role of *CELF1* in DM1 was supported by the fact that transgenic mice overexpressing *CELF1* reproduce splicing misregulation as well as DM1 muscle features [73,74]. Furthermore, increased levels of *CELF1* is also found in the DM1 mouse model expressing inducible 960 interrupted CTG repeats, which exhibits muscle wasting as well

as splicing defects that are only related to *CELF1* (e.g. *Capzb*, *Mfn2*, *Ank2* and *Fxr1h*) and not to *MBNL1*, suggesting that the elevation of *CELF1* could participate to the DM1 muscle phenotype [22].

3.3. Perturbation of other processes

Expression of CUGexp-RNAs results in alternative splicing misregulation due to the depletion and/or stabilization of *MBNL1* and *CELF1* RNA-binding proteins, respectively. The modulation of their regulatory splicing activities suggests that the multiple RNA-processing events regulated by these RNA-binding proteins may also be altered. In the same way, the activity of *CELF1* varies depending on its cellular localization. In the nucleus, *CELF1* acts as a splicing regulator whereas in the cytoplasm, it can regulate the translational activity of proteins like p21 and MEF2A, which are involved in muscle cell differentiation [75,76]. A concomitant translational deregulation of *CELF1* targets and associated functions indicate that other post-transcriptional mechanisms could also be altered by the CUGexp-RNAs. Nevertheless, their exact contribution to the DM1 phenotype needs to be determined.

Unlike *CELF1*, no effect on translation has been described for *MBNL1* yet, even though *MBNL1* is also present in the cytoplasmic compartment. Alternative splicing results in the production of several isoforms of *MBNL1* and the associated protein isoforms have been shown to have either a nuclear or a nucleo-cytoplasmic localization [77]. It should be noted that the splicing of *MBNL1* itself is altered in DM1 leading to increased levels of the nuclear isoforms. However the impact of such alterations on the activities of *MBNL1* is still not clearly understood. More recently, a novel function of *MBNL1* as a regulator of miRNA biogenesis has been described [78]. *MBNL1* has been demonstrated to bind to a motif located within the loop of pre-miR-1 and compete with the binding of LIN28, which promotes pre-miR-1 uridylation and blocks Dicer processing. Consistent with *MBNL1* loss-of-function, miR-1 processing is altered in the heart samples of DM1 patients and this alteration is associated with aberrant expression of miR-1 targets such as *CACNA1* and *GJA1* that encode calcium and gap junction channels, respectively. This finding suggests that CUGexp-RNAs trans-effect on miR-1 processing could contribute to the cardiac dysfunction described in this disease [78]. Interestingly, other miRNA were also deregulated in muscles of DM1 patients suggesting that the deregulation of such small non-coding RNA could have an impact on DM1 pathology [79,80].

Furthermore, several studies have described transcriptional modifications that may also participate to DM1 pathogenesis. Deep analysis of DM1 mouse models revealed that in addition to splicing defects, the expression of a large number of transcripts was deregulated indicating that CUGexp-RNA expression could interfere at both post-transcriptional and transcriptional levels [66,67]. A study even proposed a “leaching” of several transcription factors (including RAR α , SP1 and 3, STAT 1/3) from the chromatin in DM1 cells and their sequestration by the CUGexp-RNAs ribonucleoprotein complexes [81]. A decreased expression of two *SLITRK* genes has been recently identified in a model of DM1 neural cells and in DM1 brain tissues [82]. The mechanism that causes the modification in *SLITRK* gene expression is still unclear but this alteration affects both neurite outgrowth and synaptogenesis, and may contribute to the functional neuropathological defects observed in DM1 patients. In contrast, abnormal activation of the transcription factor NKX2-5 has been described in severely affected DM1 patients however the mechanism involved in this process is ill-defined [83]. Overall, there are increasing evidences suggesting that the CUGexp-RNAs may interfere with gene expression but further studies are required to determine the pathophysiological consequences.

4. Inhibition of RNA toxicity

Expression and nuclear retention of the mutated DMPK transcripts that contain CUG expansions in the 3' non-coding region are of primary importance in the development of the DM1 pathology. These CUGexp-RNAs that induce trans-dominant effects, are central and may be the causal elements of the toxic RNA gain-of-function mechanism involved in DM1 (Fig. 1). Thus, inhibition of this RNA toxicity by targeting the CUGexp-RNAs represents a valuable therapeutic strategy for this disease. The first set of RNA-based approaches targeting the DMPK transcripts was developed using viral vectors. Expression of hammerhead ribozymes (catalytic RNA) and antisense RNA designed to target DMPK mRNA were able to degrade and reduce the level of the pathogenic RNA as well as correct the defective phenotypes in DM1 muscle cells *in vitro* [84,85]. Unfortunately, both approaches do not discriminate between wild-type and mutant DMPK transcripts leading to the degradation of both DMPK gene products. However in mice, loss of *Dmpk* induces only a mild phenotype in old animals [18] suggesting that the destruction of DMPK mRNA by antisense approaches that activate RNase H enzymes are attractive and potential therapeutic strategies for DM1.

More recently, a second set of approaches that target directly the CUG repeat expansion by using small antisense (CAG)_n

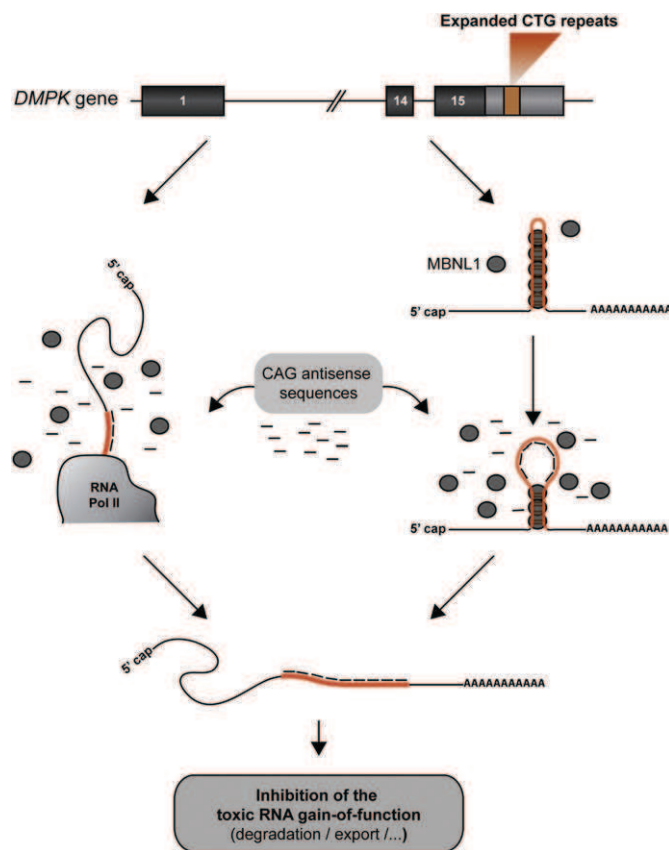


Fig. 2. Targeting the expanded repeats as therapeutic strategy. Expanded CUG repeats form hairpin structures and sequester MBNL1 proteins into ribonuclear complexes. Addition of exogenous (CAG)_n antisense sequences efficiently removes the nuclear foci and inhibits the toxic RNA gain-of-function induced by the CUGexp-RNAs. Depending on their composition, the (CAG)_n antisense sequences allow either the export/translation of the CUGexp-RNAs followed by its rapid cytoplasmic degradation or nuclear degradation of the expanded transcript. The antisense (CAG)_n sequences could either delocalize MBNL1 from the hairpin-structured CUG repeats or prevent the formation of new foci through inhibition of MBNL1 binding to nascent transcripts.

sequences has been evaluated. Small (CAG)_n of either modified oligonucleotides or antisense sequences linked to modified U7-small nuclear snRNA, are able to target the CUGexp-RNAs and inhibit their toxicity in DM1 cellular or mouse models [86–88]. These strategies were shown to exhibit an efficient export and/or degradation of the CUGexp-RNAs and were associated with the correction of DM1 defects like misregulation of alternative splicing. The use of CAG25 morpholinos in DM1 mice results in the release of MBNL1 from the foci, export of the CUGexp-RNAs into the cytoplasm and their subsequent degradation [88]. The use of (CAG)₈ 2'-O-methyl phosphorotioates and hU7-snRNA-(CAG)₁₅ induce a selective degradation of the mutant transcripts in DM1 cells and have little or no effect on the wild-type DMPK transcripts [86,87]. The precise mechanisms leading to the inhibition of RNA toxicity by using small antisense sequences targeting the expanded CUG repeats are not yet fully understood. However breaking of the CUGexp-RNA/MBNL1 complexes and/or preventing the formation of new foci by using (CAG)_n antisense sequences may allow degradation of the mutant transcripts by endogenous RNase H independent processes (Fig. 2). Interestingly, MBNL1 release from the foci using small compounds able to bind to (CUG)_n repeats like pentamidine, could also reverse some mis-splicing defects in DM1 models [89]. Despite the absence of defined mechanism, similar approaches were successfully used in cellular models of HD and SCA3 diseases [90,91] indicating that the targeting of expanded repeats is a promising therapeutic strategy for triplet expansion disorders.

5. Concluding remarks

Over the years, the RNA gain-of-function has progressively emerged as a pathogenic mechanism for the complex DM1 disease. Alternative splicing misregulation of several pre-mRNAs due to the altered activities of MBNL1 and CELF1 RNA-binding proteins by CUGexp-RNAs, contributes to the DM1 pathophysiology. However it seems unlikely that it can explain the wide spectrum of DM1 clinical symptoms. The CUGexp-RNAs have effects in *trans* and alter other processes at both post-transcriptional (miRNA processing, translation) and transcriptional levels. By interfering with RNA metabolism of either coding or non-coding RNAs, the CUGexp-RNAs may act indirectly on the expression of various proteins in a tissue-specific manner. Even if it has not been confirmed yet, such misregulations may participate to the complex and multisystemic DM1 phenotype. Interestingly, nuclear RNA foci that colocalize with RNA-binding proteins as well as splicing defects have already been described for other diseases with expanded repeats including DM2, FXTAS, SCA8, and in a lesser extent HDL2 and SCA31, suggesting that a toxic RNA gain-of-function mechanism may contribute to their pathogenesis (Table 1). This mechanism is probably not restricted to diseases with repeat expansions in non-coding regions since RNA toxicity was also described in HD and SCA3 diseases, which have expanded triplet repeats in coding regions. Their CAGexp-RNAs are able to form nuclear foci, to colocalize with RNA-binding proteins like MBNL1 and exhibit toxicity in animal models [39–41,54]. Conversely the presence of polyglutamine aggregates in DM1, SCA8 and HDL2 raises the possibility that both group of diseases, with coding and non-coding repeat expansions, share to some extent, common pathophysiological mechanisms.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Association Francaise contre les Myopathies (AFM), UPMC (Emergence program), Inserm, CNRS, ANR-Genopath for their financial support.

References

- [1] H.T. Orr, H.Y. Zoghbi, Trinucleotide repeat disorders, *Annu. Rev. Neurosci.* 30 (2007) 575–621.
- [2] P.S. Harper, The genetic basis of myotonic dystrophy. in: W. Saunders (Ed.), *Myotonic Dystrophy*. WB Saunders, London, 2001, pp. 307–363.
- [3] J.D. Brook, M.E. McCurrach, H.G. Harley, A.J. Buckler, D. Church, H. Aburatani, 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 (1992) 799–808.
- [4] M. Mahadevan, C. Tsilifidis, L. Sabourin, G. Shutler, C. Amemiya, G. Jansen, C. Neville, M. Narang, J. Barcelo, K. O'Hoy, et al., Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene, *Science* 255 (1992) 1253–1255.
- [5] W.J. Groh, M.R. Groh, C. Shen, D.G. Monckton, C.L. Bodkin, R.M. Pascuzzi, Survival and CTG repeat expansion in adults with myotonic dystrophy type 1, *Muscle Nerve* 43 (2011) 648–651.
- [6] A. Hunter, C. Tsilifidis, G. Mettler, P. Jacob, M. Mahadevan, L. Surh, R. Korneluk, The correlation of age of onset with CTG trinucleotide repeat amplification in myotonic dystrophy, *J. Med. Genet.* 29 (1992) 774–779.
- [7] C. Tsilifidis, A.E. MacKenzie, G. Mettler, J. Barcelo, R.G. Korneluk, Correlation between CTG trinucleotide repeat length and frequency of severe congenital myotonic dystrophy, *Nat. Genet.* 1 (1992) 192–195.
- [8] P.S. Harper, H.G. Harley, W. Reardon, D.J. Shaw, Anticipation in myotonic dystrophy: new light on an old problem, *Am. J. Hum. Genet.* 51 (1992) 10–16.
- [9] C. Lavedan, H. Hofmann-Radvanyi, P. Shelbourne, J.P. Rabes, C. Duros, D. Savoy, I. Dehaupas, S. Luce, K. Johnson, C. Junien, Myotonic dystrophy: size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism, *Am. J. Hum. Genet.* 52 (1993) 875–883.
- [10] B.M. Davis, M.E. McCurrach, K.L. Taneja, R.H. Singer, D.E. Housman, 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 (1997) 7388–7393.
- [11] K.L. Taneja, M. McCurrach, M. Schalling, D. Housman, R.H. Singer, Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues, *J. Cell. Biol.* 128 (1995) 995–1002.
- [12] Y.-H. Fu, A. Pizzuti, R.G.J. Fenwick, J. King, S. Rajnarayan, P.W. Dunne, J. Dubel, G.A. Nasser, T. Ashizawa, P. de Jong, An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy, *Science* 255 (1992) 1256–1258.
- [13] D. Furling, L. Coiffier, V. Mouly, J.P. Barbet, J.L. St Guily, K. Taneja, G. Gourdon, C. Junien, G.S. Butler-Browne, Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 2079–2087.
- [14] D. Furling, T. Lam le, O. Agbulut, G.S. Butler-Browne, G.E. Morris, Changes in myotonic dystrophy protein kinase levels and muscle development in congenital myotonic dystrophy, *Am. J. Pathol.* 162 (2003) 1001–1009.
- [15] M. Maeda, C.S. Taft, E.W. Bush, E. Holder, W.M. Bailey, H. Neville, M.B. Perryman, R.D. Bies, Identification, tissue-specific expression, and subcellular localization of the 80- and 71-kDa forms of myotonic dystrophy kinase protein, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 20246–20249.
- [16] G. Jansen, P.J. Groenen, D. Bachner, P.H. Jap, M. Coerwinkel, F. Oerlemans, W. van den Broek, B. Gohlsch, D. Pette, J.J. Plomp, P.C. Molenaar, M.G. Nederhoff, C.J. van Echteld, M. Dekker, A. Berns, H. Hameister, B. Wieringa, Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice, *Nat. Genet.* 13 (1996) 316–324.
- [17] T.R. Klesert, D.H. Cho, J.I. Clark, J. Maylie, J. Adelman, L. Snider, E.C. Yuen, P. Soriano, S.J. Tapscott, Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy, *Nat. Genet.* 25 (2000) 105–109.
- [18] S. Reddy, D.B. Smith, M.M. Rich, J.M. Lefterovich, P. Reilly, B.M. Davis, K. Tran, H. Rayburn, R. Bronson, D. Cros, R.J. Balice-Gordon, D. Housman, Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy, *Nat. Genet.* 13 (1996) 325–335.
- [19] P.S. Sarkar, B. Appukuttan, J. Han, Y. Ito, C. Ai, W. Tsai, Y. Chai, J.T. Stout, S. Reddy, Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts, *Nat. Genet.* 25 (2000) 110–114.
- [20] A. Mankodi, E. Logigian, L. Callahan, C. McClain, R. White, D. Henderson, M. Krym, C.A. Thornton, Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat, *Science* 289 (2000) 1769–1773.
- [21] H. Seznec, O. Agbulut, N. Sergeant, C. Savouret, A. Ghestem, N. Tabti, J.C. Willer, L. Ourth, C. Duros, E. Brisson, C. Fouquet, G. Butler-Browne, A. Delacourte, C. Junien, G. Gourdon, Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 2717–2726.
- [22] J.P. Orengo, P. Chambon, D. Metzger, D.R. Mosier, G.J. Snipes, T.A. Cooper, Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 2646–2651.
- [23] A. Vignaud, A. Ferry, A. Hugué, M. Baraibar, C. Trollet, J. Hyzewicz, G. Butler-Browne, J. Puymirat, G. Gourdon, D. Furling, Progressive skeletal muscle weakness in transgenic mice expressing CTG expansions is associated with the activation of the ubiquitin-proteasome pathway, *Neuromuscul. Disord.* 20 (2010) 319–325.
- [24] C.L. Liguori, K. Ricker, M.L. Moseley, J.F. Jacobsen, W. Kress, S.L. Naylor, J.W. Day, L.P. Ranum, Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9, *Science* 293 (2001) 864–867.
- [25] I. Holt, S. Mittal, D. Furling, G.S. Butler-Browne, J.D. Brook, G.E. Morris, Defective mRNA in myotonic dystrophy accumulates at the periphery of nuclear splicing speckles, *Genes Cells* 12 (2007) 1035–1048.
- [26] K.P. Smith, M. Byron, C. Johnson, Y. Xing, J.B. Lawrence, Defining early steps in mRNA transport: mutant mRNA in myotonic dystrophy type I is blocked at entry into SC-35 domains, *J. Cell. Biol.* 178 (2007) 951–964.
- [27] S. Michalowski, J.W. Miller, C.R. Urbinati, M. Paliouras, M.S. Swanson, J. Griffith, Visualization of double-stranded RNAs from the myotonic dystrophy protein kinase gene and interactions with CUG-binding protein, *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 3534–3542.
- [28] J.W. Miller, C.R. Urbinati, P. Teng-Umuay, M.G. Stenberg, B.J. Byrne, C.A. Thornton, M.S. Swanson, Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy, *EMBO J.* 19 (2000) 4439–4448.
- [29] B.H. Mooers, J.S. Logue, J.A. Berglund, The structural basis of myotonic dystrophy from the crystal structure of CUG repeats, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 16626–16631.
- [30] B. Tian, R.J. White, T. Xia, S. Welle, D.H. Turner, M.B. Mathews, C.A. Thornton, Expanded CUG repeat RNAs form hairpins that activate the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR, *RNA* 6 (2000) 79–87.
- [31] W. Dansithong, S. Paul, L. Comai, S. Reddy, MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 5773–5780.
- [32] J.M. Margolis, B.G. Schoser, M.L. Moseley, J.W. Day, L.P. Ranum, DM2 intronic expansions: evidence for CCUG accumulation without flanking sequence or effects on ZNF9 mRNA processing or protein expression, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 1808–1815.
- [33] O. Raheem, S.E. Olufemi, L.L. Bachinski, A. Vihola, M. Siroto, J. Holmlund-Hampf, H. Haapasalo, Y.P. Li, B. Udd, R. Krahe, Mutant (CCTG)_n expansion causes abnormal expression of zinc finger protein 9 (ZNF9) in myotonic dystrophy type 2, *Am. J. Pathol.* 177 (2010) 3025–3036.
- [34] N.P. Mastroyiannopoulos, M.L. Feldman, J.B. Uney, M.S. Mahadevan, L.A. Phylactou, Woodchuck post-transcriptional element induces nuclear export of myotonic dystrophy 3' untranslated region transcripts, *EMBO Rep.* 6 (2005) 458–463.
- [35] W. Dansithong, C.M. Wolf, P. Sarkar, S. Paul, A. Chiang, I. Holt, G.E. Morris, D. Branco, M.C. Sherwood, L. Comai, C.I. Berul, S. Reddy, Cytoplasmic CUG RNA foci are insufficient to elicit key DM1 features, *PLoS One* 3 (2008) e3968.
- [36] D.H. Cho, C.P. Thienes, S.E. Mahoney, E. Analau, G.N. Filippova, S.J. Tapscott, Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF, *Mol. Cell* 20 (2005) 483–489.
- [37] R. Batra, K. Charizanis, M.S. Swanson, Partners in crime: bidirectional transcription in unstable microsatellite disease, *Hum. Mol. Genet.* 19 (2010) R77–R82.
- [38] Y. He, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, N. Papadopoulos, K.W. Kinzler, The antisense transcriptomes of human cells, *Science* 322 (2008) 1855–1857.
- [39] M. de Mezer, M. Wojciechowska, M. Napierala, K. Sobczak, W.J. Krzyzosiak, Mutant CAG repeats of Huntingtin transcript fold into hairpins, form nuclear foci and are targets for RNA interference, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 3852–3863.
- [40] L.B. Li, Z. Yu, X. Teng, N.M. Bonini, RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*, *Nature* 453 (2008) 1107–1111.
- [41] R.J. Hsu, K.M. Hsiao, M.J. Lin, C.Y. Li, L.C. Wang, L.K. Chen, H. Pan, Long tract of untranslated CAG repeats is deleterious in transgenic mice, *PLoS One* 6 (2011) e16417.
- [42] Z. Yu, X. Teng, N.M. Bonini, Triplet repeat-derived siRNAs enhance RNA-mediated toxicity in a *Drosophila* model for myotonic dystrophy, *PLoS Genet.* 7 (2011) e1001340.
- [43] J. Krol, A. Fiszler, A. Mykowska, K. Sobczak, M. de Mezer, W.J. Krzyzosiak, Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets, *Mol. Cell* 25 (2007) 575–586.
- [44] T. Zu, B. Gibbens, N.S. Doty, M. Gomes-Pereira, A. Hugué, M.D. Stone, J. Margolis, M. Peterson, T.W. Markowski, M.A. Ingram, Z. Nan, C. Forster, W.C. Low, B. Schoser, N.V. Somia, H.B. Clark, S. Schmechel, P.B. Bitterman, G. Gourdon, M.S. Swanson, M. Moseley, L.P. Ranum, Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (2010) 260–265.
- [45] A.F. Klein, M. Ebihara, C. Alexander, M.J. Dicaire, A.M. Sasseville, Y. Langelier, G.A. Rouleau, B. Brais, PABPN1 polyalanine tract deletion and long expansions modify its aggregation pattern and expression, *Exp. Cell. Res.* 314 (2008) 1652–1666.
- [46] A. Michalik, C. Van Broeckhoven, Pathogenesis of polyglutamine disorders: aggregation revisited, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) R173–R186.
- [47] Y. Oma, Y. Kino, N. Sasagawa, S. Ishiura, Comparative analysis of the cytotoxicity of homopolymeric amino acids, *Biochim. Biophys. Acta* 1748 (2005) 174–179.
- [48] R.J. Osborne, C.A. Thornton, RNA-dominant diseases, *Hum. Mol. Genet.* 15 (Suppl. 2) (2006) R162–R169.
- [49] A. Kalsotra, X. Xiao, A.J. Ward, J.C. Castle, J.M. Johnson, C.B. Burge, T.A. Cooper, A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 20333–20338.
- [50] X. Lin, J.W. Miller, A. Mankodi, R.N. Kanadia, Y. Yuan, R.T. Moxley, M.S. Swanson, C.A. Thornton, Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 2087–2097.
- [51] J.P. Orengo, A.J. Ward, T.A. Cooper, Alternative splicing dysregulation secondary to skeletal muscle regeneration, *Ann. Neurol.* 69 (2011) 681–690.

- [52] L.E. Thornell, M. Lindstom, V. Renault, A. Klein, V. Mouly, T. Ansved, G. Butler-Browne, D. Furling, Satellite cell dysfunction contributes to the progressive muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 35 (2009) 603–613.
- [53] A.V. Philips, L.T. Timchenko, T.A. Cooper, Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy, *Science* 280 (1998) 737–741.
- [54] L.C. Wang, K.Y. Chen, H. Pan, C.C. Wu, P.H. Chen, Y.T. Liao, C. Li, M.L. Huang, K.M. Hsiao, Muscleblind participates in RNA toxicity of expanded CAG and CUG repeats in *Caenorhabditis elegans*, *Cell Mol. Life Sci.* 68 (2011) 1255–1267.
- [55] R.S. Savkur, A.V. Philips, T.A. Cooper, Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy, *Nat. Genet.* 29 (2001) 40–47.
- [56] B.N. Charlet, R.S. Savkur, G. Singh, A.V. Philips, E.A. Grice, T.A. Cooper, Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing, *Mol. Cell* 10 (2002) 45–53.
- [57] A. Mankodi, M.P. Takahashi, H. Jiang, C.L. Beck, W.J. Bowers, R.T. Moxley, S.C. Cannon, C.A. Thornton, Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy, *Mol. Cell* 10 (2002) 35–44.
- [58] T. Kimura, M. Nakamori, J.D. Lueck, P. Pouliquin, F. Aoike, H. Fujimura, R.T. Dirksen, M.P. Takahashi, A.F. Dulhunty, S. Sakoda, Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 2189–2200.
- [59] A. Buj-Bello, D. Furling, H. Tronchere, J. Laporte, T. Lerouge, G.S. Butler-Browne, J.L. Mandel, Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 2297–2307.
- [60] N. Sergeant, B. Sablonniere, S. Schraen-Maschke, A. Ghestem, C.A. Muraige, A. Watez, P. Vermersch, A. Delacourte, Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 2143–2155.
- [61] H. Jiang, A. Mankodi, M.S. Swanson, R.T. Moxley, C.A. Thornton, 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 (2004) 3079–3088.
- [62] T.M. Wheeler, J.D. Lueck, M.S. Swanson, R.T. Dirksen, C.A. Thornton, Correction of CIC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 3952–3957.
- [63] C. Fugier, A.F. Klein, C. Hammer, S. Vassilopoulos, Y. Ivarsson, A. Toussaint, V. Tosch, A. Vignaud, A. Ferry, N. Messadeg, Y. Kokunai, R. Tsuburaya, P. de la Grange, D. Dembele, V. Francois, G. Precigout, C. Boulade-Ladame, M.C. Hummel, A.L. de Munain, N. Sergeant, A. Laquerriere, C. Thibault, F. Deryckere, D. Auboeuf, L. Garcia, P. Zimmermann, B. Udd, B. Schoser, M.P. Takahashi, I. Nishino, G. Bassez, J. Laporte, D. Furling, N. Charlet-Berguerand, Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy, *Nat. Med.* 17 (2011) 720–725.
- [64] M. Pascual, M. Vicente, L. Monferrer, R. Artero, The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing, *Differentiation* 74 (2006) 65–80.
- [65] R.N. Kanadia, K.A. Johnstone, A. Mankodi, C. Lungu, C.A. Thornton, D. Esson, A.M. Timmers, W.W. Hauswirth, M.S. Swanson, A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy, *Science* 302 (2003) 1978–1980.
- [66] H. Du, M.S. Cline, R.J. Osborne, D.L. Tuttle, T.A. Clark, J.P. Donohue, M.P. Hall, L. Shiu, M.S. Swanson, C.A. Thornton, M. Ares Jr., Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17 (2010) 187–193.
- [67] R.J. Osborne, X. Lin, S. Welle, K. Sobczak, J.R. O'Rourke, M.S. Swanson, C.A. Thornton, Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy, *Hum. Mol. Genet.* 18 (2009) 1471–1481.
- [68] R.N. Kanadia, J. Shin, Y. Yuan, S.G. Beattie, T.M. Wheeler, C.A. Thornton, M.S. Swanson, 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 (2006) 11748–11753.
- [69] C. Barreau, L. Paillard, A. Mereau, H.B. Osborne, Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions, *Biochimie* 88 (2006) 515–525.
- [70] N.A. Timchenko, Z.J. Cai, A.L. Welm, S. Reddy, T. Ashizawa, L.T. Timchenko, RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 7820–7826.
- [71] G.S. Wang, M.N. Kuyumcu-Martinez, S. Sarma, N. Mathur, X.H. Wehrens, T.A. Cooper, PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 3797–3806.
- [72] N.M. Kuyumcu-Martinez, G.S. Wang, T.A. Cooper, Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation, *Mol. Cell* 28 (2007) 68–78.
- [73] M. Koshelev, S. Sarma, R.E. Price, X.H. Wehrens, T.A. Cooper, Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1, *Hum. Mol. Genet.* 19 (2010) 1066–1075.
- [74] A.J. Ward, M. Rimer, J.M. Killian, J.J. Dowling, T.A. Cooper, CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1, *Hum. Mol. Genet.* 19 (2010) 3614–3622.
- [75] N.A. Timchenko, R. Patel, P. Iakova, Z.J. Cai, L. Quan, L.T. Timchenko, Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 13129–13139.
- [76] P. Iakova, G.L. Wang, L. Timchenko, M. Michalak, O.M. Pereira-Smith, J.R. Smith, N.A. Timchenko, Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate, *EMBO J.* 23 (2004) 406–417.
- [77] H. Tran, N. Gourrier, C. Lemerrier, C.M. Dhaenens, A. Vautrin, F.J. Fernandez-Gomez, L. Arandel, C. Carpentier, H. Obriot, S. Eddarkouli, L. Delattre, E. Van Brussels, I. Holt, G. Morris, B. Sablonniere, L. Buee, N. Charlet-Berguerand, S. Schraen-Maschke, D. Furling, I. Behm-Ansmant, C. Branlant, M.L. Cailliet-Boudin, N. Sergeant, Analysis of exonic-regions involved in nuclear localization, splicing activity and dimerization of muscleblind-like-1 isoforms, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 16435–16446.
- [78] F. Rau, F. Freyermuth, C. Fugier, J.P. Villemin, M.C. Fischer, B. Jost, D. Dembele, G. Gourdon, A. Nicole, D. Duboc, K. Wahbi, J.W. Day, H. Fujimura, M.P. Takahashi, D. Auboeuf, N. Dreumont, D. Furling, N. Charlet-Berguerand, Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (2011) 840–845.
- [79] R. Perbellini, S. Greco, G. Sarra-Ferraris, R. Cardani, M.C. Capogrossi, G. Meola, F. Martelli, Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1, *Neuromuscul. Disord.* 21 (2011) 81–88.
- [80] S. Gambardella, F. Rinaldi, S.M. Lepore, A. Viola, E. Loro, C. Angelini, L. Vergani, G. Novelli, A. Botta, Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients, *J. Transl. Med.* 8 (2010) 48.
- [81] A. Ebralidze, Y. Wang, V. Petkova, K. Ebralidze, R.P. Junghans, RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy, *Science* 303 (2004) 383–387.
- [82] A. Marteyn, Y. Maury, M.M. Gauthier, C. Lecuyer, R. Vernet, J.A. Denis, G. Pietu, M. Peschanski, C. Martinat, Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy, *Cell Stem Cell* 8 (2011) 434–444.
- [83] R.S. Yadava, C.D. Frenzel-McCardell, Q. Yu, V. Srinivasan, A.L. Tucker, J. Puymirat, C.A. Thornton, O.W. Prall, R.P. Harvey, M.S. Mahadevan, RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression, *Nat. Genet.* 40 (2008) 61–68.
- [84] D. Furling, G. Doucet, M.A. Langlois, L. Timchenko, E. Belanger, L. Cossette, J. Puymirat, Viral vector producing antisense RNA restores myotonic dystrophy myoblast functions, *Gene Ther.* 10 (2003) 795–802.
- [85] M.A. Langlois, N.S. Lee, J.J. Rossi, J. Puymirat, Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts, *Mol. Ther.* 7 (2003) 670–680.
- [86] V. Francois, A.F. Klein, C. Beley, A. Jollet, C. Lemerrier, L. Garcia, D. Furling, Selective silencing of mutated mRNAs in DM1 by using modified hU7-sRNAs, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (2011) 85–87.
- [87] S.A. Mulders, W.J. van den Broek, T.M. Wheeler, H.J. Croes, P. van Kuik-Romeijn, S.J. de Kimpe, D. Furling, G.J. Platenburg, G. Gourdon, C.A. Thornton, B. Wieringa, D.G. Wansink, Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 13915–13920.
- [88] T.M. Wheeler, K. Sobczak, J.D. Lueck, R.J. Osborne, X. Lin, R.T. Dirksen, C.A. Thornton, Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA, *Science* 325 (2009) 336–339.
- [89] M.B. Warf, M. Nakamori, C.M. Matthys, C.A. Thornton, J.A. Berglund, Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 18551–18556.
- [90] J. Hu, M. Matsui, K.T. Gagnon, J.C. Schwartz, S. Gabillet, K. Arar, J. Wu, I. Bezprozvanny, D.R. Corey, Allele-specific silencing of mutant Huntingtin and ataxin-3 genes by targeting expanded CAG repeats in mRNAs, *Nat. Biotechnol.* 27 (2009) 478–484.
- [91] K.T. Gagnon, H.M. Pendergraft, G.F. Deleavey, E.E. Swayze, P. Potier, J. Randolph, E.B. Roesch, J. Chattopadhyaya, M.J. Damha, C.F. Bennett, C. Montallier, M. Lemaitre, D.R. Corey, Allele-selective inhibition of mutant Huntingtin expression with antisense oligonucleotides targeting the expanded CAG repeat, *Biochemistry* 49 (2010) 10166–10178.

New function for the RNA helicase p68/DDX5 as a modifier of MBNL1 activity on expanded CUG repeats

François-Xavier Laurent¹, Alain Sureau¹, Arnaud F Klein², François Trouslard¹, Erwan Gasnier², Denis Furling² and Joëlle Marie^{1,*}

¹Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, UPR 3404, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, Université Paris-Sud, Orsay and ²UPMC University Paris 06, Um76, Institut de Myologie and CNRS, UMR7215, and INSERM, U974, F-75013, Paris, France

Received August 22, 2011; Revised and Accepted November 23, 2011

ABSTRACT

Myotonic Dystrophy type I (DM1) is caused by an abnormal expansion of CTG triplets in the 3' UTR of the *dystrophia myotonica protein kinase (DMPK)* gene, leading to the aggregation of the mutant transcript in nuclear RNA foci. The expanded mutant transcript promotes the sequestration of the MBNL1 splicing factor, resulting in the misregulation of a subset of alternative splicing events. In this study, we identify the DEAD-box RNA helicase p68 (DDX5) in complexes assembled onto *in vitro*-transcribed CUG repeats. We showed that p68 colocalized with RNA foci in cells expressing the 3'UTR of the *DMPK* gene containing expanded CTG repeats. We found that p68 increased MBNL1 binding onto pathological repeats and the stem-loop structure regulatory element within the cardiac Troponin T (TNNT2) pre-mRNA, splicing of which is misregulated in DM1. Mutations in the helicase core of p68 prevented both the stimulatory effect of the protein on MBNL1 binding and the colocalization of p68 with CUG repeats, suggesting that remodeling of RNA secondary structure by p68 facilitates MBNL1 binding. We also found that the competence of p68 for regulating TNNT2 exon 5 inclusion depended on the integrity of MBNL1 binding sites. We propose that p68 acts as a modifier of MBNL1 activity on splicing targets and pathogenic RNA.

INTRODUCTION

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a dominant autosomal neuromuscular disorder, characterized by multisystemic defects affecting muscle, heart, brain and

endocrine systems (1). DM1 is one the most frequent form of muscular dystrophy in adults that is caused by an expansion of CTG triplets in the 3' untranslated region of the *dystrophia myotonica protein kinase (DMPK)* gene (2–4). The mutant allele is transcribed, correctly spliced and polyadenylated but it is not translated into a protein. Instead, expanded transcripts are retained in the nucleus and accumulate as discrete RNA foci, located at the boundary of nuclear speckles (5–7). However, nuclear/cytoplasmic distribution of mutant DMPK remains controversial as cytoplasmic aggregates have also been detected (8). It is now well established that the expanded CUG repeats are toxic for the cells and play a major role in DM1 pathogenesis. Based on structural studies on short CUG repeats, it has been proposed that expanded CUG repeats fold into an imperfect hairpin structure that interferes with the activities of RNA binding proteins and alters their normal cellular function. The muscleblind-like 1 protein (MBNL1) was identified by its ability to bind to CUG repeats (9). MBNL1 is a splicing factor that interacts with RNA through its zinc-finger domains. Recently it has been shown that MBNL1 binds to single-stranded and structured RNA, which raises the question of how the protein recognizes different RNA targets (10). In the DM1 context, MBNL1 colocalizes with nuclear foci of CUG repeats and its sequestration by the expanded repeats leads to a loss-of-function of the protein [review in refs (11,12)]. Another RNA-binding protein involved in DM1 is CUGBP1. This factor plays an important role in several post-transcriptional processing steps, including translation, RNA stability and alternative splicing. Instead of being sequestered by the repeats, the steady-state level of CUGBP1 is increased in DM1 tissues due to its hyperphosphorylation by protein kinase C, leading to a gain of activity of the protein (13). MBNL1 and CUGBP1 are antagonistic splicing factors that are involved in the reprogramming of splicing events during fetal to post-natal development in muscle (14). The sequestration

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 1 69 82 38 00; Fax: +33 1 69 82 38 77; Email: marie@cgm.cnrs-gif.fr

of MBNL1 and the upregulation of CUGBP1 in DM1 are proposed to trigger the misregulation of alternative splicing of a subset of muscle and brain-specific transcripts, leading to the re-expression of fetal isoforms in adult tissues. Several of these abnormal splicing events correlate with clinical symptoms such as myotonia, insulin resistance and heart conduction defects, which are caused by the misregulation of the muscle-chloride channel, insulin receptor (INSR) and cardiac Troponin T (TNNT2) pre-mRNA, respectively (15–18). In addition to MBNL1 and CUGBP1, other factors such as transcription factors and hnRNP F/H have been proposed to be involved in DM1 (19,20). However, their function in the disease is unclear. Studies using the CUG RNA fly model have identified modifiers of CUG toxicity phenotypes (21), suggesting that factors or signaling pathway other than MBNL1 and CUGBP1 could be involved in DM1 pathogenesis. Recently, the mislocalization of the transcription factor SHARP in DM1 has been associated with alteration of steady-state levels of numerous mRNAs that are important for muscle development (22). Moreover, a recent study has demonstrated that the processing of the pre-miR1 is altered in DM1, reinforcing the idea that other mechanisms are involved in DM1 pathophysiology (23).

The aim of this work was to isolate new factors that bind to CUG repeats. Using an affinity chromatography strategy with an RNA containing 95 pure CUG repeats, we identified the RNA helicase p68 (DDX5). p68 is a prototype of DEAD-box RNA helicase proteins. This family is characterized by a conserved core, consisting of nine conserved motifs including the DEAD signature, which gives rise to the name to these proteins (24). p68 is involved in many aspects of RNA metabolism including transcription, RNA processing, RNA export, translation and mRNA degradation (25,26). Here, we show that p68 colocalizes with RNA foci in different cell types that overexpressed expanded CUG repeats. *In vitro* experiments suggest that p68 promotes a conformational change of CUG repeats that favors MBNL1 binding or stabilizes the complex through additional interactions. We also found that p68 regulates alternative splicing of TNNT2 exon 5 and we demonstrate that the competence for regulation depends on MBNL1. From these results, we propose that p68 acts as a modifier of MBNL1 activity on splicing targets and pathogenic RNAs.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids and constructions

Plasmid CTG 95 was constructed by cloning polymerase chain reaction (PCR) fragment containing CTG repeats in plasmid pSP72 that was digested with PvuII. CTG repeats were obtained by PCR using a sense oligonucleotide containing 7 CTG repeats and an antisense oligonucleotide containing 7 CAG repeats. PCR fragments containing varying lengths of CTG repeats were purified on agarose gel and cloned into the pSP72 plasmid. Several clones were subjected to sequence analysis. According to the orientation of the repeats in the plasmid, different lengths of

CUG or CAG repeats were obtained. Plasmid CTG 95 contains 95 CTG repeats. Plasmid CAG 61 contains 61 CAG repeats. Plasmids containing 14 CTG repeats or 16 CAG repeats were chosen for gel retardation assays. Plasmid-containing 62 CCTG repeats were obtained by PCR using a sense oligonucleotide containing 6 CCTG repeats and an antisense oligonucleotide containing 6 CAGG repeats. PCR fragments were cloned into the pSP72 plasmid and proceed as for CTG and CAG plasmids. Plasmids containing the 3'UTR of *DMPK* gene with 5 or 200 pure CTG repeats were described previously (27). Plasmid-expressing *DMPK* exons 11–15 containing 960 interrupted CUG repeats in exon 15 were described previously (28). The 3' UTR of *DMPK* gene containing 960 interrupted CTG was also cloned into a Tet-on inducible lentiviral construct as previously described (29). Mutations in the helicase core domains II and IV of human p68/DDX5 were made by reverse PCR from pcDNA4 p68/Ha-Myc-His provided by Dr D. Auboeuf. For mutation in domain II (p68 mt2), sense and antisense oligonucleotides are 5'-AGATAGA ATGCTTGATATGGGC-3' and 5'-GCTTCATTAAGG ACAAGGTAGG-3', respectively. For mutation in domain IV (p68 mt4), sense and antisense oligonucleotides are 5'-GCTGTGGAAACCAAAAGAAGA-3' and 5'-AA CAATGGTTTTATTCTCCTTCTC-3', respectively. The wild-type and mutant 4G cardiac Troponin T (TNNT2) minigenes were described previously (30). Mutant TNNT2, CUG stem (CUGS) and GUF were described previously (31). The TNNT2 RNA used for UV-cross-linking experiments was generated by PCR from the wild-type TNNT2 plasmid using sense and antisense oligonucleotides (5'-ACACATACGATTTAGGTGACA CTATAGAACCAGACTAACCTGT-3' and 5'-CTGA GGTTCCAGGGAGTGG-3', respectively). Plasmid p68 for expression in *Escherichia coli* was generated by PCR from pcDNA4 p68/Ha-Myc-His using a sense oligonucleotide (5'-ATCTAGGATCCATGTCCGGGTTATTC GA-3') and an antisense oligonucleotide (5'-AGATCTC GAGTTGGGAATATCCTGT-3'). The PCR product after digestion with NdeI and XhoI was cloned in a variant of pet28 (gift from Dr H. Le Hir) that was digested by NdeI and XhoI. This vector contained in the N-terminal a CBP tag followed by a TEV protease and in the C-terminal a His-tag (32). The deletion of a C-terminal part of p68 giving rise to p68 Δ Ct2 was made by reverse PCR using a sense oligonucleotide (5'-CTCGAGCACCA CCACCACCACACTGA-3') and an antisense oligonucleotide (5'-ATAATTTTCCCTGTCTCTAA-3') using pet28/p68 as a template. p68 Δ Ct2 containing mutations in the helicase core domains II and IV were made by reverse PCR from wild-type p68 Δ Ct2. Plasmid pGEX-6P1-MBNL1/40 kDa isoform was described previously (33).

Affinity capture of protein complexes and MALDI analysis

HeLa cell nuclear extracts were purchased from A. Miller (Cilbiotech, B-7000 Mons, Belgium). Myoblast and myotube nuclear extracts from C2C12 were prepared as

described (34). Biotinylated *in vitro*-transcribed CUG95 repeats bound to streptavidin agarose were incubated with 40% nuclear extracts under splicing conditions as described (35). Proteins eluted from the beads were separated by electrophoresis and detected by Coomassie staining. Fourteen protein bands were excised from the gel and identified using a nanoLC MS/MS-Orbitrap spectrometer (platform of proteomic of South-West Paris, INRA).

Purification of recombinant proteins

Recombinant protein GST-MBNL1 and GST-UAP56 (DDX39) were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified using Glutathione Uniflow resin (BD biosciences Clontech) according to standard procedure. GST-UAP56 was treated by thrombin to eliminate the GST tag according to standard procedure. Recombinant protein p68 Δ Ct2 and eIF4A3 were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and successively purified on calmodulin resin (Stratagene) and on nickel sepharose (GE-healthcare) as previously described (32). Proteins were dialyzed against buffer D (36).

Western blot analysis and antibodies

Western blots were performed according to standard procedure with the following antibodies: anti-MBNL1 monoclonal antibodies [MB1a(4A8), gift from Dr G. Morris (7)], anti-p68 /DDX5 monoclonal antibodies (1/200, SantaCruz, sc 81350), anti-p72/DDX17 polyclonal antibodies (1/1000, Bethyl laboratories A300-509 A), anti-Myc monoclonal antibodies (1/500, sigma), anti-Flag monoclonal antibodies (1/500), anti-Emerin (1/500, SantaCruz, sc25284). The bands were detected with the SuperSignal West Pico detection kit (Pierce) and quantified with a Fuji LAS 3000.

UV-cross-linking, immunoprecipitation and gel retardation experiments

RNAs for gel shift experiments and UV-cross-linking experiments were transcribed using a cap analogue and SP6 or T7 RNA polymerase in the presence of [α - 32 P]UTP or [α - 32 P]CTP. Uniformly labeled RNA (10 fmol) were incubated for 15 min at 30°C, in 10 μ l with recombinant MBNL1 and p68 as indicated in the figures under splicing conditions with 0.5 mM ATP, 1 mM MgCl₂ and 20 mM creatine-phosphate. Samples were UV irradiated for 15 min and treated with 0.3 μ g RNase A and 10 U of RNase T1 at 37°C for 30 min. Immunoprecipitation experiments were carried out as described with anti-MBNL1 (clone 3A4, sc47740 SantaCruz) or p68 monoclonal antibodies immobilized on A/G agarose (34). The cross-linked proteins were resolved on a 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel and visualized by a PhosphorImager. RNA mobility shift assays were performed as described with recombinant MBNL1 and p68 Δ Ct2 as indicated in the figures (37). Recombinant proteins were diluted in Dignam buffer D containing 0.5 mg/ml bovine serum albumin (BSA). The reaction was incubated for 15 min at 30°C and the protein complexes were resolved by electrophoresis on a 4% non-denaturing polyacrylamide gel

(39/1), 0.5 \times Tris/Borate/EDTA buffer (TBE). RNA bands were quantified using a PhosphorImager (Molecular Dynamics).

Cell culture

Cos, HeLa and N1E115 cells were grown at 37°C in Dulbecco's-modified Eagle's medium with 4500 mg/l D-glucose (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. C2C12 cells were grown in the same medium supplemented with 20% fetal bovine serum. Human muscle cells were derived from primary human satellite cells and immortalized as described (38). Cells were grown in Ham's F10 medium supplemented with 20% fetal bovine serum and antibiotics. Cultures of human myoblasts were also infected with lentiviral vector expressing the Tet-on inducible 960 CTG construct. Transduction was carried out overnight in the presence of polybrene (4 μ g/ml) as previously described (39). Cells were grown in the same medium as above but with 50 μ g/ml Gentamicin (Invitrogen). For immunofluorescence cells were seeded in 24-well vessel and grown to ~90% confluence. Cells were co transfected with 0.4 μ g of plasmids expressing the repeats and 0.4 μ g of plasmids encoding proteins using lipofectamin 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. For plasmid DNA transfection, human muscle cells were seeded in six-well vessel, and grown to ~90% confluence. Cells were cotransfected with 0.5 μ g minigenes and protein expression vectors with lipofectamine LTX plus reagent (Invitrogen, ratio 3:1), according to the manufacturer's recommendations. Cells were harvested 24 h later. RNA and proteins were prepared from the same plates using NucleoSpin RNA/protein kit (Macherey-Nagel) and splicing patterns were analyzed by RT-PCR in the presence of [32 P]dCTP as previously described (37). PCR products were resolved on 6% denaturing polyacrylamide gels and quantified using a PhosphorImager. siRNAs and primers are listed in [Supplementary Table S3](#). siRNA duplex was transfected at 50 nM with lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) in growth medium without antibiotics. Twenty-four hours later, the cells were cotransfected with 50 nM siRNA and 0.5 μ g of minigene and p68 or MBNL1 expression plasmid using lipofectamine 2000 (Invitrogen). The media was replaced with growth medium lacking antibiotics 3 h later. Cells were harvested 24 h after transfection of the minigene. RNA and proteins were prepared as described above.

RNA-FISH combined with immunofluorescence

FISH was done as described using (CAG)₈-Cy3 DNA oligonucleotide probe (40). Glass coverslips containing plated cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4) for 20 min and washed three times with PBS. The coverslips were incubated for 5 min in PBS/0.5% Triton X-100 and washed three times with PBS before prehybridization in 30% formamide, 2 \times SCC for 10 min. The coverslips were hybridized for 2 h at 37°C in 30% formamide, 2 \times SCC, 2 mM vanadyl ribonucleoside, 10 μ g/ml BSA and 0.5 μ g (CAG)₈-Cy3 DNA oligonucleotide probe (Sigma). The coverslips were washed twice in

2× SCC/30% formamide at 42°C and twice in 1× SCC at room temperature. Following FISH, the coverslips were washed twice in PBS. The coverslips were incubated with primary antibodies DDX5 (1/2000 dilution, Abcam ab21696), c-myc (1/500 dilution, clone 9E10; Santa Cruz), M2-FLAG (1/200 dilution, clone A2220, Sigma) and polyclonal antibodies DDX17 (1/400 dilution, Bethyl laboratories A300-509 A) in PBS/0.1% BSA at room temperature for 60 min. The coverslips were washed four times with PBS/0.1% Tween20 before incubation with a goat anti-rabbit or rabbit anti-mouse secondary antibody conjugated with Alexa-Fluor 488 (1/1000 dilution; Molecular probes, Invitrogen) in PBS/0.1% BSA for 60 min. Then, the coverslips were incubated for 10 min in PBS/0.1% BSA/DAPI (1/10 000 dilution) and rinsed twice in PBS before mounting in Fluorescent Mounting Medium (DAKO). Slides were examined using either a simple fluorescence microscope (Leica) or a Leica DM4000 B confocal microscope, equipped with a Leica 100× HCX Plan Apo CS 1.40 objective, in 1- μ m optical sections.

RESULTS

p68/DDX5 and p72/DDX17 form aggregates that colocalize with CUG repeats

In an attempt to find novel factors involved in DM1 pathophysiology, protein complexes assembled onto biotinylated CUG repeats were purified by affinity chromatography on streptavidin-agarose beads. We verified that MBNL1 from HeLa nuclear extracts became cross-linked to a biotinylated RNA containing 95 pure CUG repeats (Figure 1A). Therefore, streptavidin-agarose beads coupled to the biotinylated (CUG)95 RNA was used to capture protein complexes from HeLa or myogenic nuclear extracts. After several washing steps,

proteins were eluted and separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Numerous proteins were detected (Figure 1B). Some are common to the three nuclear extracts tested while others seemed to be specific to the cell type or to the differentiation status of muscle cells (Figure 1B). Fourteen bands were selected, from which about 100 proteins were identified by mass-spectrometry (Figure 1B and Supplementary Table S1). We focused on proteins that presented interesting features regarding their properties (double-stranded RNA proteins, splicing factors) or because they are involved in myogenesis (Figure 1B). To test the putative implication of the candidates in DM1, we investigated the localization of the proteins by RNA-FISH/immunofluorescence experiments in HeLa cells that had been cotransfected with a plasmid encoding the 3'UTR of the *DMPK* gene containing either 960 interrupted CTG repeats (28) or non-expanded repeats (5 CTG) as a control. Most of the candidates did not colocalize with RNA foci as exemplified by the RNA helicase UAP56/DDX39 and the splicing factor CDC5L (Supplementary Figure S1 and Supplementary Table S2). In contrast, the RNA helicase p68 (DDX5) colocalized with RNA foci (Figure 2). In the absence of expanded repeats, myc-tagged p68 showed a diffuse localization in the nucleoplasm. However in the presence of expanded repeats, p68-myc formed aggregates that colocalized with the foci as shown by FISH/immunofluorescence using anti-Myc monoclonal antibodies (Figure 2A). The colocalization of exogenous p68 was not cell-line dependent, because aggregates were observed in different cell types such as myogenic (C2C12) and neuronal (NIE115) cell lines (Supplementary Figure S2). We also showed that p68 accumulates with CUG RNA foci in cells that had been cotransfected with a 3'UTR *DMPK* minigene containing 200 pure CUG repeats (41) (Figure 2A). We next tested whether endogenous p68 colocalizes with CUG

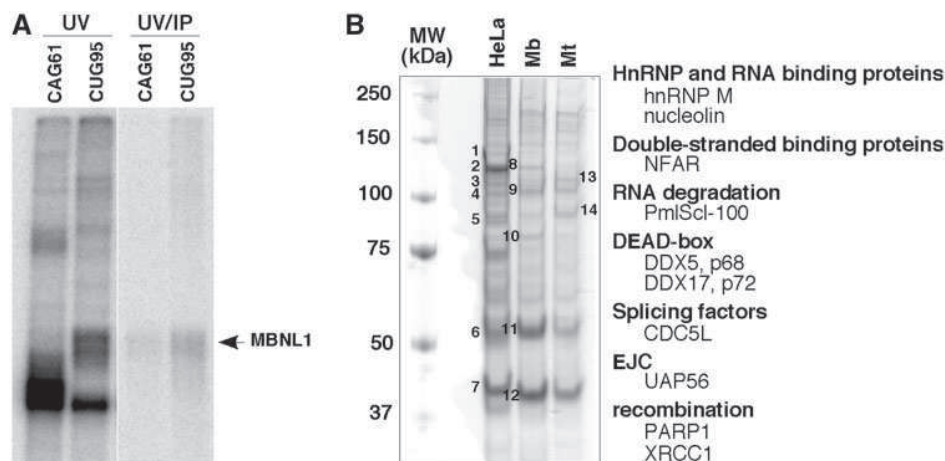


Figure 1. Affinity capture of protein complexes from HeLa and myogenic nuclear extracts by an *in vitro* transcribed RNA containing 95 CUG repeats. (A) MBNL1 is cross-linked to 32 P-labeled CUG95 repeats. *In vitro* transcribed (CUG)95 or (CAG)61 RNAs labelled with [α - 32 P]CTP were incubated with 40% HeLa nuclear extracts. After UV cross-linking an aliquot was precipitated with anti-MBNL1 antibodies. The cross-linked proteins were separated by SDS-PAGE. (B) Proteins from HeLa nuclear extracts, myoblast (Mb) and myotube (Mt) nuclear extracts from C2C12 were separated onto a 10% polyacrylamide denaturing gel and detected by Coomassie Brilliant Blue staining. Numbers 1 through 14 refer to bands that have been cut out from the gel and identified by mass-spectrometry. A subset of proteins identified by mass spectrometry is indicated.

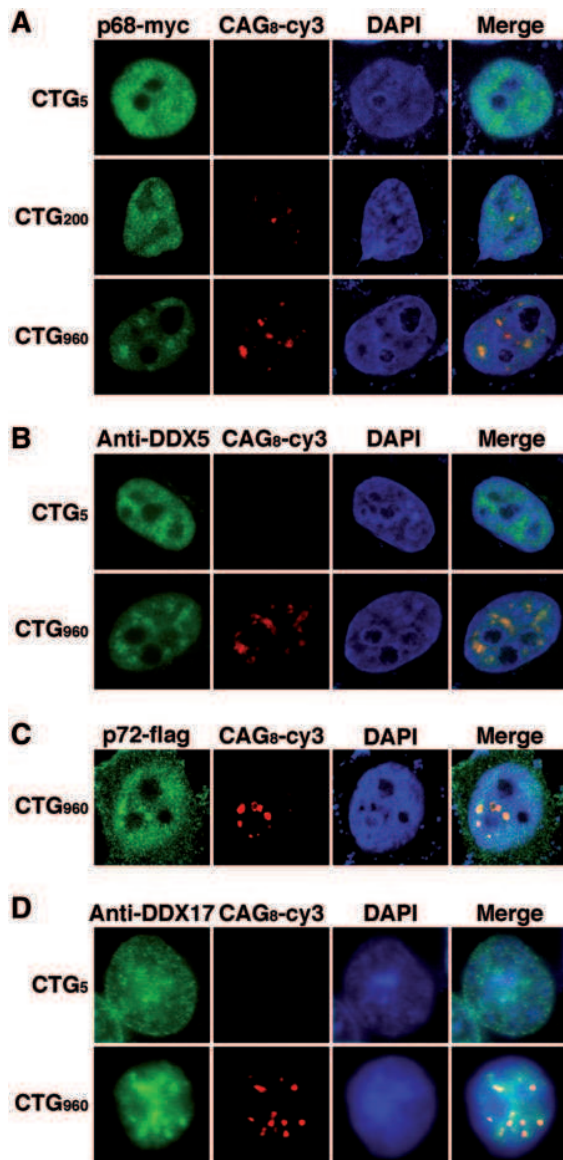


Figure 2. p68 and p72 colocalized with CUG RNA foci in HeLa cells. (A) Cells were cotransfected with a plasmid encoding p68-myc and plasmids expressing either 5, 200 or 960 CTG repeats. Expression of p68-myc was detected by immunofluorescence using monoclonal anti-Myc antibodies, followed by rabbit anti-mouse A488 antibodies. Foci were detected by RNA-FISH using Cy3-labeled (CAG)₈ probes. Nuclei were stained with DAPI. (B) Endogenous p68 colocalizes with CUG repeats. p68/DDX5 was revealed with a DDX5 monoclonal antibody. (C) Same experiment as in (A) except that cells were cotransfected with a Flag-p72 expression vector. Expression of Flag-p72 was detected by immunofluorescence using anti-Flag antibodies. (D) Endogenous p72 colocalizes with CUG repeats. P72/DDX17 was revealed with DDX17 polyclonal antibodies.

repeats. Immunofluorescence with monoclonal p68 antibodies confirmed that endogenous p68 colocalized with expanded CUG repeats (Figure 2B). p72 (DDX17) is a paralog of p68 that is highly similar to p68 (42). p72 was also found in complexes associated with *in vitro* transcribed 95 CUG repeats. We thus investigated whether p72 colocalized with the 960 CUG repeats. The

results showed that p72 tagged with a flag epitope and endogenous p72 formed aggregates that colocalized with RNA foci (Figure 2C and D). In conclusion, our results suggest that the DEAD-box RNA helicases p68 and p72 are novel factors that localize in CUG RNA aggregates that recruit MBNL1.

p68 is a modifier of MBNL1 binding on CUG repeats

Structural analyses have shown that MBNL1 binds to CUG repeats via its Watson-Crick interface, suggesting that the long A-form stem of the CUG repeats must be partially unfolded (43). One function ascribed to DEAD-box RNA helicases is to separate strands of short RNA duplexes to promote the remodeling of RNA-protein complexes (25). As RNA chaperones, these proteins facilitate the correct folding of structured-RNA molecules (44). Thus, we hypothesized that RNA helicase p68 and/or p72 could locally disrupt the G-C pairs of the CUG helix allowing the recruitment or the stabilization of MBNL1 to the repeats. To test this hypothesis, recombinant protein MBNL1 was cross-linked to *in vitro* transcribed ³²P RNA containing 95 CUG repeats in the absence or presence of recombinant p68 protein under splicing conditions. We focused on p68 because recombinant p72 was insoluble in our hands. To increase the solubility of the recombinant p68 in *E. coli*, 100 amino-acids of p68 were deleted from the C-terminus, keeping NLS and NES signals intact (45). This truncated p68 protein (p68 Δ Ct2) was still able to colocalize with the RNA foci of expanded CUG repeats and to regulate splicing (see below) as did the full-length p68 (Supplementary Figure S3). As previously observed in other studies (9), MBNL1 was cross-linked to CUG repeats even in the absence of p68 (Figure 3A). However, in the presence of increasing concentrations of recombinant p68, the amount of MBNL1 cross-linked to the repeats was significantly increased (Figure 3A and supplementary Figure S4). Immunoprecipitation with monoclonal antibodies against MBNL1 confirmed that the cross-linked band was indeed MBNL1 (Figure 3B). As already reported, p68 was not efficiently cross-linked to RNA using UV-cross-linking (46). However, we confirmed the interaction of p68 with CUG repeats by gel retardation assays (Supplementary Figure S5). It has been shown that MBNL1 was recruited to RNA foci in cells expressing CAG repeats (28). Thus, we tested whether p68 had an effect on MBNL1 binding on these repeats. Results shown in Figure 3C indicated that p68 was able to increase the binding of MBNL1 on CAG repeats in a similar range to those obtained on CUG repeats. Myotonic dystrophy type 2 (DM2) is the second form of myotonic dystrophy (47). It has been shown that expanded CCUG repeats in DM2 also form RNA foci that recruit MBNL1 (48). Interestingly, the stimulating effect of p68 was less efficient on CCUG repeats than on the other repeats (Figure 3C). This suggests that the effect of p68 on MBNL1 binding might depend on particular structural features embedded in the repeats. We next tested whether the stimulating effect on MBNL1 binding was specific to p68. UV-cross-linking experiments were

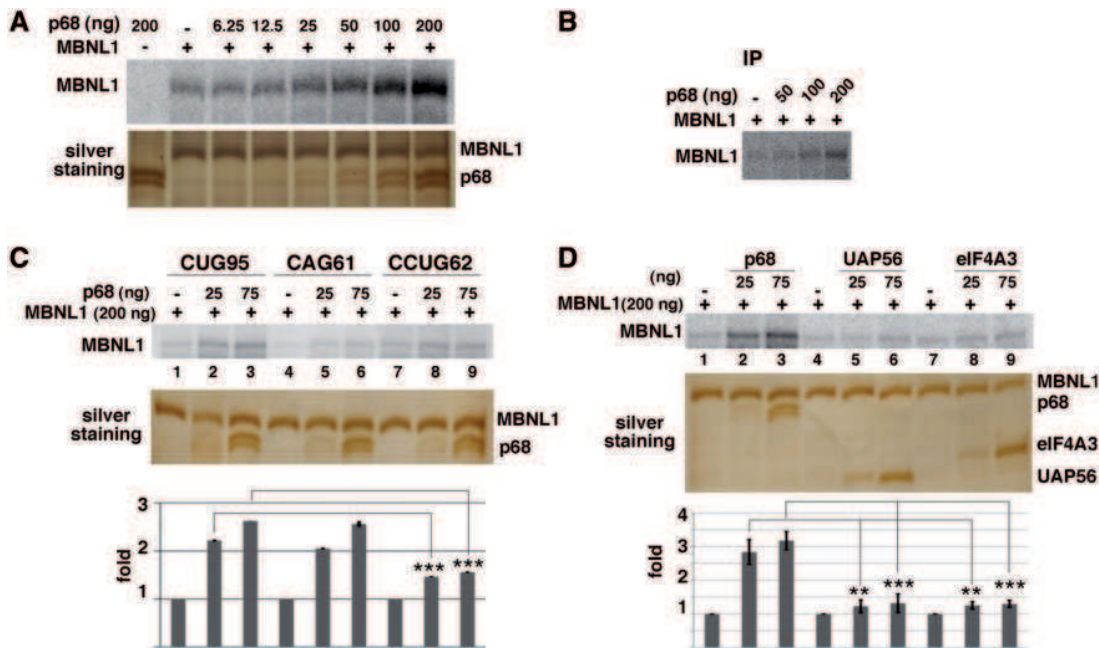


Figure 3. p8 increases the binding of MBNL1 to 95 CUG repeats. (A) Plasmid (CUG)95 was *in vitro* transcribed in the presence of [α - 32 P]UTP. Labeled (CUG)95 RNA was incubated with a constant amount of recombinant MBNL1 protein (200 ng) and increasing amounts of recombinant p68 Δ Ct2 under splicing conditions with ATP. Proteins cross-linked to labeled RNA were separated on a 10% SDS-PAGE. Bottom image shows a silver stain of a gel run in parallel. Note that p68 Δ Ct2 migrates as two bands that are recognized by anti-p68 antibodies (data not shown). (B) The cross-linked proteins shown in (A) were immunoprecipitated with anti-MBNL1 antibodies and separated by SDS-PAGE. (C) (CUG)95, (CAG)61 and (CCUG)62 RNAs were labeled with [α - 32 P]CTP and used for UV-cross-linking experiments. (D) The increase of cross-linked MBNL1 to CUG repeats is specific to p68. Labeled (CUG)95 was incubated with 200 ng of recombinant MBNL1 protein and 25 or 75 ng of recombinant p68 Δ Ct2, UAP56 or eIF4A3 proteins. Quantifications result from three independent experiments, with error bars indicating standard deviation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

performed in the presence of UAP56/DDX39, one of the candidates found in complexes assembled onto (CUG)95 repeats and another DEAD-box protein, eIF4A3. The stimulation was markedly reduced in the presence of either UAP56 or eIF4A3, suggesting that p68 exhibits specificity toward the repeats despite the fact that the catalytic core of the DEAD-box helicase family is highly conserved (Figure 3D). To further characterize the requirement of p68 for MBNL1 binding, we tested whether mutations that affected ATPase/helicase activity and RNA binding altered the stimulatory effect of p68 on MBNL1 binding. Mutations D248N of the DEAD-box motif and mutation F346A in motif IV, which have been shown to be important for these activities in other DEAD-box proteins (24,49) reduced by 2-fold the ability of p68 to stimulate MBNL1 binding (Figure 4A). Consistent with this *in vitro* analysis, mutations in both the DEAD motif and RNA binding motif IV abolish colocalization of p68 to RNA foci (Figure 4B). Altogether, these results suggest that p68 acts as a specific factor to facilitate MBNL1 binding onto CUG repeats. Previous experiments have proposed that MBNL1 is a primary determinant of RNA foci formation (50). To examine whether knockdown of both p68 and p72 by siRNA has an effect on RNA foci formation, human muscle cells were transduced with a 960 CTG construct under the control of a Tet-on inducible promoter. RNA foci were detected as early as 1 h following the addition of

doxycycline to the culture medium (Figure 5). In contrast, the number of nuclei showing RNA foci was significantly reduced in induced cells treated by siRNA against p68 and p72, particularly at the early time points (1, 3 and 6 h) following doxycycline addition. No difference could be observed at 24 h between induced-cells that were treated or non-treated by siRNA against both p68 and p72 (Figure 5). Altogether, our results suggest that p68 and p72 play a role in the formation of RNA foci by facilitating the binding of MBNL1 and that the interaction of these proteins with RNA foci is transient.

p68 regulates alternative splicing of TNNT2 that is misregulated in DM1

One of the characteristic features of DM1 is the misregulation of alternative splicing of a subset of transcripts that resulted in the re-expression of fetal isoforms in adult tissues. It was shown that some of these events are responsive to MBNL1. In this study, we have found that p68 modifies MBNL1 binding on CUG repeats. Therefore, we wondered whether p68 played a role in the regulation of alternative splicing events that are regulated by MBNL1 and misregulated in DM1. To test this hypothesis we first inactivated both p68 and p72 by siRNA interference using a siRNA that targeted both proteins. Western blot analysis showed that about 95% of p68 was depleted from the cells (Figure 6A). The level of p72 depletion was also around 95% (Supplementary

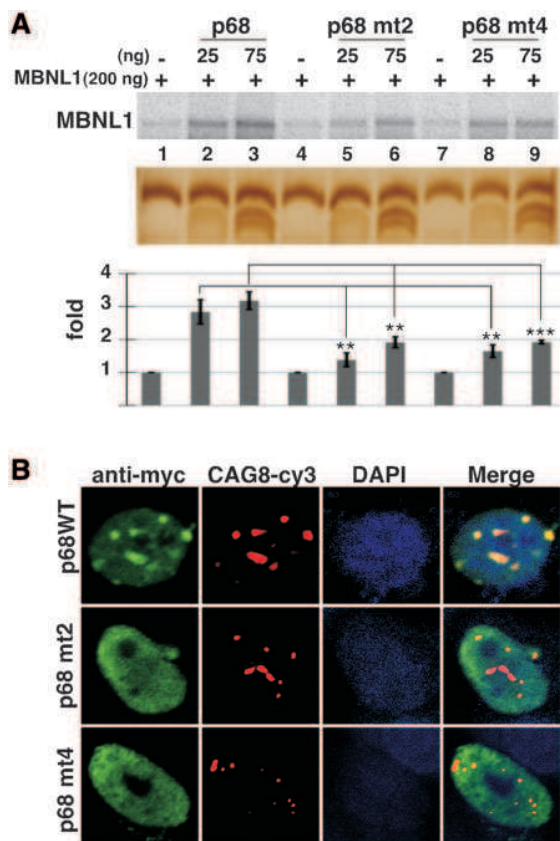


Figure 4. (A) Mutations in the helicase core domain of p68 modify its ability to increase MBNL1 binding. UV-cross-linking experiments with labeled (CUG)95 were performed with 200 ng of recombinant MBNL1 and 25 or 75 ng of wild-type recombinant p68 Δ Ct2 or p68 Δ Ct2 mutated in domain II (p68 mt2, mutation D248N), or in domain IV (p68 mt4, mutation F346A). Quantifications result from three independent experiments, with error bars indicating standard deviation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (B) Mutations in the helicase core domain of p68 strongly affect colocalization of the protein with CUG repeats. RNA/FISH experiments were performed as described in Figure 2 with wild-type p68-myc expressing vector or p68-myc expressing vectors mutated in domain II (DEAD) or IV.

Figure S6). The knockdown of both p68 and p72-activated splicing of endogenous TNNT2 alternative exon 5 as a MBNL1 knockdown did, but it had no effect on alternative splicing of INSR exon 11 or on either sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (ATP2A1) exon 22 or MBNL1 exon 7 (Figure 6B). Thus, these results suggest that p68 and/or p72 regulates a subset of alternative splicing events. It has been found that p68 and p72 could display distinct functions. Notably, it has been shown that p68 and p72 have different abilities to activate splicing of the CD44 alternative exons (51). To test whether the increase of TNNT2 exon 5 inclusion upon inactivation of p68 and p72 was specific to one of these two proteins, we performed individual p68 and p72 knockdown experiments. All of the siRNAs tested that targeted different regions of p68 or p72 were able to increase TNNT2 exon 5 inclusion (Supplementary Figure S6). This suggests that both p68 and p72 are regulators of splicing TNNT2 exon 5. Recently, it has been

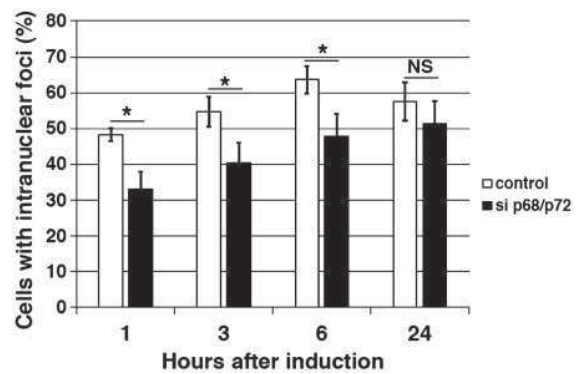


Figure 5. P68 and p72 facilitate RNA foci formation. Human muscle cells expressing 960-interrupted CTG repeats under the control of a Tet-on inducible promoter was used to attend the early steps of RNA foci formation. The number of nuclei containing foci was determined at different times after doxycycline addition (1, 3, 6 and 24 h) in non-treated or treated cells by siRNA to inhibit p68/p72. SiRNA duplexes were transfected 48 h before CUG repeats induction by doxycycline. Quantification results from three independent experiments. Approximately 300 cells were counted for each condition, with error bars indicating standard deviation * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

proposed that MBNL1 binding sites identified in TNNT2 are embedded in a stem-loop structure containing pyrimidine-pyrimidine mismatches that is similar to the CUG repeats, suggesting that MBNL1 recognizes these structures through a common mechanism (31). Thus, we hypothesized that RNA helicases p68 and p72 might facilitate MBNL1 binding in TNNT2 pre-mRNA as it does for the CUG repeats. To test this proposal, we performed UV-cross-linking experiments with an RNA encompassing the regulatory stem-loop element. Figure 7A showed that indeed p68 increased the binding of MBNL1 onto the regulatory element. Then, we asked whether mutations that reduce MBNL1 binding would impair regulation of TNNT2 exon 5 by p68. To answer this question, we used several TNNT2 minigenes (obtained from the groups of T. Cooper and A. Berglund), in which several mutations had been introduced to disrupt MBNL1 binding and/or the stem-loop RNA structure (Figure 7B) (30,31). Human myoblasts were cotransfected with wild-type and mutant TNNT2 minigenes that include exon 4-6 and with vectors overexpressing p68 or MBNL1. In agreement with siRNA experiments, overexpression of p68 repressed exon 5 inclusion as did MBNL1 (Figure 7B). As previously reported by Ho *et al.* and Warf *et al.*, the 4G minigene in which mutations disrupted the RNA structure and MBNL1 binding did not respond to MBNL1 overexpression (Figure 7B). Interestingly, the 4G mutant was no longer able to respond to p68. In contrast, the CUGS mutant that still responded to MBNL1 also remained responsive to p68 regulation (Figure 7B). Finally, the GUF mutant that resulted in complete inclusion of exon 5 and became insensitive to MBNL1 regulation was also insensitive to p68 regulation (Figure 7B). These results suggested that the competence for regulating alternative splicing of TNNT2 by p68 depended on the presence of MBNL1 binding sites and the ability of MBNL1 to regulate this

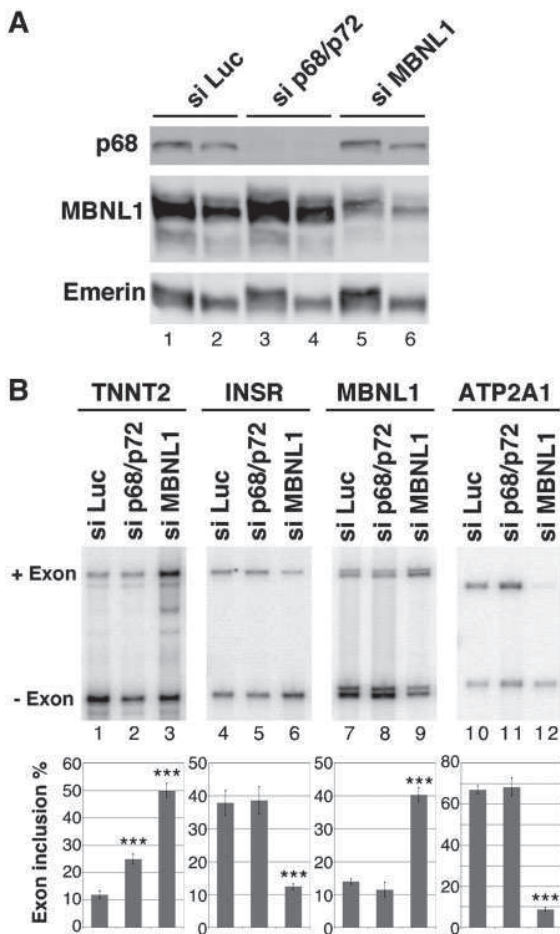


Figure 6. p68 regulates splicing of TNNT2 alternative exon 5. (A) Western blot analysis of human myoblasts treated with a control luciferase siRNA (siLuc), sip68/p72 or siMBNL1. About 15 μ g (lanes 1, 3 and 5) or 7.5 μ g (lanes 2, 4 and 6) of proteins were loaded per lane. The blot was probed with antibodies against p68, MBNL1 and emerlin as a control. (B) RT-PCR analysis of endogenous transcripts in human myoblast cells transfected with a control siRNA (siLuc), siRNA against p68/p72 or siRNA against MBNL1. The histogram shows the quantification of exon inclusion. Results are derived from six independent experiments for TNNT2 and four independent experiments for INSR, MBNL1 and ATP2A1 with error bars indicating standard deviation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

transcript. Therefore, we can anticipate that the inactivation of MBNL1 would result in the inability of p68 to regulate TNNT2 exon 5. To validate this hypothesis, we first cotransfected human myoblasts with the 3'DMPK UTR containing 5 or 960 CTG repeats and the TNNT2 minigene in the presence or absence of a vector coding for p68 (Figure 8A). We used an expression vector encoding PTB that is a repressor of exon 5 inclusion as a control (52). As previously observed in other studies and consistent with sequestration of MBNL1 by the repeats, expressing CUG repeats resulted in an increase of TNNT2 exon 5 inclusion (12) (Figure 8A). Interestingly, p68 was not able to regulate inclusion of TNNT2 exon 5 when 960 CUG repeats were expressed. In contrast, p68 was still able to regulate TNNT2 exon 5 in control experiments where only

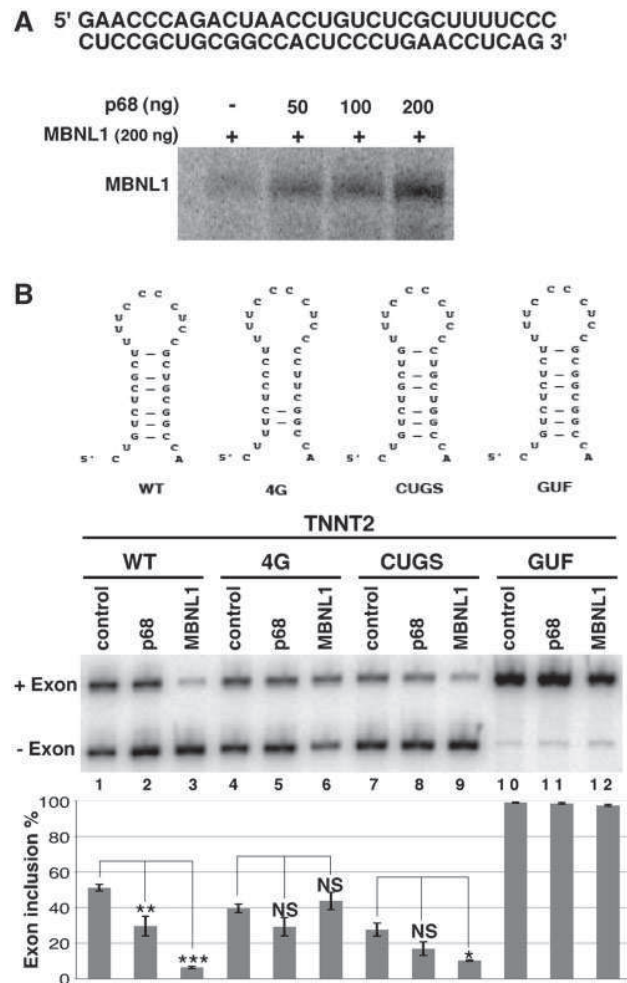


Figure 7. RNA stem-loop mutations that abolish MBNL1 binding impair the regulation by p68. (A) p68 stimulates binding of MBNL1 onto the stem-loop regulatory element of TNNT2. Labeled stem-loop regulatory RNA was incubated with a constant amount of recombinant MBNL1 protein (200 ng) and increasing amounts of recombinant p68 Δ Ct2. Proteins cross-linked to labeled RNA were separated on a 10% SDS-PAGE. The TNNT2 RNA used for cross-linking experiments is indicated. (B) RT-PCR analysis of splicing of TNNT2 alternative exon 5 in wild-type and mutant minigenes. Schematic representation of wild-type and mutant stem-loop structure within TNNT2 intron 4 [adapted from ref. (31)] is shown. Human myoblast cells were cotransfected with wild-type or mutant TNNT2 minigenes and expression vector coding for p68 (lanes 2, 5, 8 and 11) or MBNL1 (lanes 3, 6, 9 and 12). The histogram shows the quantification of exon 5 inclusion. Results are derived from at least three experiments, except for lanes 4, 6, 7, 9, 10 and 12, which are derived from two experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. NS: non-specific.

five CUG repeats were expressed. This finding was not due to a general effect of the repeats on splicing, because repression of exon 5 inclusions by PTB was the same regardless of the expressed CUG repeats length. We then tested the ability of p68 to regulate TNNT2 exon 5 inclusions after inactivation of MBNL1 by siRNA (Figure 8B). In agreement with previous studies, knockdown of MBNL1 increased splicing of TNNT2 exon 5 (Figure 8B). As already shown (Figure 8B), cotransfecting cells with a plasmid coding p68 resulted in a 2-fold decrease of

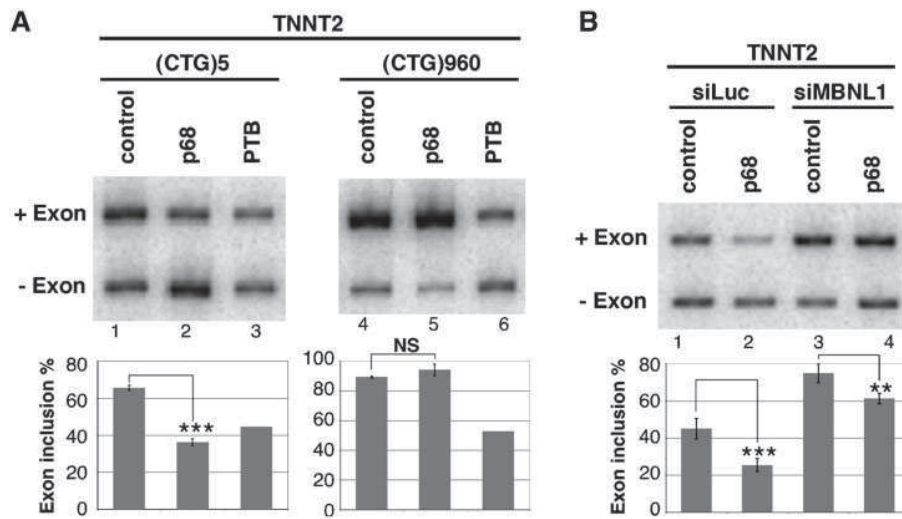


Figure 8. Sequestration of MBNL1 by CUG repeats or MBNL1 knockdown by siRNA makes splicing of TNNT2 exon 5 non-responsive to p68. (A) RT-PCR analysis of TNNT2 minigene in human myoblast cells cotransfected with the 3' UTR *DMPK* minigene containing 5 (lanes 1–3) or 960 (lanes 4 to 6) CTG repeats and a p68 expression vector (lanes 2 and 5) or as a control a PTB expression vector (lanes 3 and 6). The histogram shows the quantification of exon 5 inclusion. Results are from at least two experiments except lanes 3 and 6, for which a single experiment was performed. (B) RT-PCR analysis of TNNT2 minigene in human myoblast cells transfected with a control siRNA (lanes 1 and 2) or siRNA against MBNL1 (lanes 3 and 4) and a p68 expression vector (lanes 2 and 4). The histogram shows the quantification of exon 5 inclusion. Results are from four experiments with error bars indicating standard deviation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

TNNT2 exon 5 splicing. In contrast, splicing of TNNT2 exon 5 became less sensitive to p68 when cells were deprived of MBNL1. Consistent with these results, splicing of TNNT2 exon 5 became unresponsive to the knockdown of both p68 and p72 in DM1 myoblasts (Supplementary Figure S7). Altogether, these results demonstrate that p68 regulates the splicing of TNNT2 exon 5 alternative exon and suggest that p68-mediated regulation depends on MBNL1 binding.

DISCUSSION

DEAD-box proteins are a well-characterized class of RNA helicases that play essential roles in cellular processes involving RNA (25,26). Their basic functions are to remodel RNA and RNA-protein complexes. In this study, we identified DEAD-box RNA helicases p68 and p72 in complexes that assembled onto pure CUG repeats. We showed that these proteins colocalized with RNA foci formed by the 3'UTR of *DMPK* mRNA-containing 200 or 960 CUG repeats. In particular, we found that p68 increases the binding of MBNL1 onto *in vitro* transcribed CUG repeats. Moreover, we showed that TNNT2-mediated splicing regulation by p68 is dependent on MBNL1 binding sites. On the basis of our results we suggest that p68 acts as a modifier of MBNL1 activity by facilitating the binding of MBNL1 onto the repeats and splicing target.

Affinity chromatography is a powerful method that has been used to decode the composition of protein complexes that assemble onto RNA. Using pure CUG repeats as bait, about 100 proteins were identified by mass-spectrometry. Many of them are hnRNP and are involved in several aspect of RNA metabolism (Figure 1 and Supplementary Table 1). Surprisingly, MBNL1 was

not found in MS spectra. A similar observation was made by Kim *et al.* (53), who also did not detect MBNL1 in complexes purified using 46CUG repeats. However, in accordance with Miller *et al.* (9), we showed that MBNL1 is one of the major proteins from nuclear extracts that becomes cross-linked to the 95 CUG repeats (Figure 1A). In addition, MBNL1 was detected in the elution fraction from the affinity chromatography by western blot analysis (data not shown). Thus, the reason for the absence of MBNL1 from MS-spectra is not completely understood. One possible explanation is that, unfortunately, the band containing MBNL1 was not excised from the gel for identification by mass-spectrometry. Another possibility is that in our experimental conditions other proteins compete with MBNL1 for binding to the repeats. Among the proteins that we identified, only the DEAD-box proteins p68 and p72 form aggregates that colocalize with expanded CUG repeats. Interestingly, a study utilizing coexpression frequency shows that MBNL1 is coexpressed with p68 and p72, suggesting that these proteins could belong to the same signaling pathway (54). Additionally, another report shows that p68 is found in complexes associated with MBNL1 in myoblasts (55). The colocalization of p68 and p72 with RNA foci was observed with overexpressed RNA containing interrupted 960 CUG repeats or pure 200 CUG repeats and was independent of the cell lines. We also found that endogenous p68 and p72 colocalized with the repeats, as did exogenous proteins, suggesting that p68 and p72 are indeed recruited to RNA foci. However, in contrast to MBNL1 our results also show that only a fraction of p68 and p72 aggregates with RNA foci. p68 and p72 proteins are involved in multiple biological pathways and play a crucial role during development (25,26). It has been shown that the

disruption of either p68 or p72 genes in mice results in a very severe phenotype that leads to early lethality (56). In addition, the same study found that the processing of several microRNAs involved in cell survival is affected in p68 and p72 homozygous mice (56). Thus, according to these findings, a sequestration mechanism of p68 and p72 that leads to a deficiency of protein function similar to that of MBNL1 seems unlikely. In fact, no colocalization of p68 with RNA foci could be observed in muscle tissues from DM1 patients or mice expressing large CTG expansions (data not shown). As recently reported, we never observed recruitment of p68 in RNA foci of DM1 myoblasts (55). However, taking advantage of an inducible system in which the expression of expanded CUG repeats is under the control of an inducible promoter, we were able to show that the knockdown of both p68 and p72 has an effect on RNA foci formation (Figure 5). The effect on the number of newly formed foci was transient following doxycycline addition suggesting that p68 and p72 act at an early stage of RNA aggregation and then are released from the RNA foci. Interestingly a recent model has been proposed by Junghans to conciliate some conflicting results of DM1 pathobiology. This model poises the existence of insoluble and soluble RNA foci with distinct binding properties (57). Thus, one possibility would be that p68 and p72 intervene in the transition between these two forms of RNA foci.

One general task of DEAD-box RNA helicase is to modify RNA structure and/or RNA protein complexes (25,26). A recent crystal analysis of two zinc-finger domains of MBNL1 with a short CGCUGU RNA shows that MBNL1 targets GC steps, indicating that G–C base pairing within the helix has to be distorted (43). On the basis of our results, we propose that the recruitment of p68 to the CUG repeats would promote structural changes of the RNA that would facilitate and/or stabilize the binding of the splicing factor MBNL1 to the repeats. Consistent with that proposal, mutations in the helicase core domain of p68 strongly decreased both the stimulation of p68 on MBNL1 binding and the colocalization of p68 with CUG repeats (Figure 4). Although we focused on the role of p68, data in other publications suggest that p68 and p72 can exist as heterodimer in the cell (58). Indeed, our results show that p68 and p72 have the same function, suggesting that at least a fraction of p68 and p72 acts functionally as heterodimers (Figure 2 and Supplementary Figure S6). We also observed that the stimulatory effect operates on CAG repeats and on the regulatory intronic sequence of TNNT2 pre-mRNA (Figures 3C and 7A). Interestingly, several biochemical and structural studies predicted that pathogenic CUG repeats and TNNT2 RNA adopt similar RNA secondary structure (31,59). For CAG repeats, recent structural analysis also suggests that CAG and CUG duplexes share structural similarities (60). Thus, we can hypothesize that these common structural elements compose the basis for p68 recognition and subsequently for the increase of MBNL1 on the RNA. In contrast, p68 only slightly increases the binding of MBNL1 onto CCUG repeats. Interestingly, MBNL1 binds to CCUG RNA with an affinity 2-fold stronger than CUG RNA

(31). However, it has been shown that CCUG has a decreased stability compared to CUG (31). Thus, it is tempting to speculate that the requirement for p68 might depend on the stability of the RNA structure. We can suggest that the less an RNA is structured, the less p68 will be needed to distort the structure. Our results are consistent with a recent study that shows that MBNL1 is able to bind to both single-stranded and double-stranded RNAs (10). The mechanism by which p68 favors the binding of MBNL1 to the CUG repeats remains unknown. Time course experiments show that there is a huge increase of MBNL1 binding in the first few minutes following incubation with p68 (Supplementary Figure S4). It is known that the DEAD-box RNA helicases as RNA chaperones, modify the folding of RNA molecules. Thus, we can speculate that p68 accelerates the transition from misfolded RNA conformation to correct folding RNA structure, suitable for MBNL1 binding. Several studies point to the importance of U–U mismatches for MBNL1 binding (59,61). Thus, we propose that the mismatches could provide an anchoring site for p68 from which local strand separation could be initiated which would allow the interaction of MBNL1 to the repeats. It also has been shown that MBNL1 forms a ring-like structure with CUG repeats. From this finding we can suggest that *in vivo* p68 accelerates formation of this structure that is proposed to be the basis for MBNL1 sequestration (59).

In this study, we provide evidence that the alternative splicing of TNNT2, which is misregulated in DM1 is regulated by p68. We also found that alternative splicing of MBNL1 exon 7, ATP2A1 exon 22 or INSR exon 11, which are regulated by MBNL1 and misregulated in DM1, are not sensitive to p68 and/or p72, suggesting that these proteins regulate specific classes of transcripts. This finding raises an intriguing question. Why does alternative splicing of some transcripts regulated by MBNL1 require p68? The answer is not yet understood, but could be related to the architecture of the MBNL1 binding sites. Indeed, a recent study of Cass and coworkers suggests that different modes of MBNL1 recognition must operate for single-stranded and structured RNA targets (10). In the case of TNNT2, MBNL1 binds to a short stem-loop RNA structure, and we show that p68 increases the binding of MBNL1 onto this RNA structure. In contrast, at least for the INSR and MBNL1 transcripts no potential RNA secondary structure has been identified within the MBNL1 response element (62,63). Thus, we can propose that p68 would be required only for splicing RNA targets in which MBNL1 binding sites are embedded into a stem-loop structure. The modification of RNA stem-loop structure is a common theme for regulating alternative splicing by p68. However, the mechanism by which p68 mediates its effect is different according to the different targets. In the case of alternative splicing of Tau exon 10 and IDX alternative exon of c-H-ras pre-mRNA, it has been shown that p68 promotes the access of U1snRNP to the 5' splice site (64) or block the binding of hnRNP H (65), respectively. Our findings provide a new mode for how p68 can regulate alternative splicing by increasing the activity of a splicing factor. We also found that preventing the binding of MBNL1 onto the RNA, either by

sequestration of the protein by expanded CUG repeats or by mutations in the MBNL1 binding sites, made TNNT2 exon 5 insensitive to p68 regulation. This suggests that the repression of TNNT2 exon 5 by p68 is dependent on MBNL1 binding to the regulatory element, and it supports the idea that p68 would not act as a splicing factor per se, but rather, would be a coregulator or a coadaptator of MBNL1 binding. Thus, we favor a model according to which p68 modifies the stem-loop RNA structure of TNNT2 as it does on the toxic CUG repeats, which allows the stabilization of MBNL1.

In conclusion, our results have identified a modifier of MBNL1 activity. We suggest that through a common mechanism, the DEAD-box RNA helicase p68 modifies the RNA secondary structures of splicing targets and pathological RNAs to facilitate or stabilize MBNL1 binding that may contribute to the pathogenesis of DM1.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data is available at NAR Online: Supplementary Tables 1–3, Supplementary Figures 1–7, Supplementary Reference [66].

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to T. Cooper (Baylor University) for DMPK CTG 960 plasmid, TNNT2 and mutant TNNT2 4G minigenes; M. Mahadevan (University of Virginia) for DMPK CTG 5 and CTG 200 plasmids; A. Berglund (University of Oregon) for mutant TNNT2 CUGS and GUF plasmids; S. Kato (University of Tokyo), F. Fuller-Pace (University of Dundee) and D. Auboeuf (Centre Léon Bérard, Lyon) for p68 and p72 plasmids; G. Morris (Centre for Inherited Neuromuscular Disease; Robert Jones and Agnes Hunt Orthopaedic Hospital) for the MBNL1 (MB1a) monoclonal antibodies; H. Le Hir (Ecole Normale Supérieure, Paris) for recombinant eIF4A3 protein; O. Cordin and J. Banroques (Institut de Biologie Physico-chimique, Paris) for recombinant UAP56 protein. N. Gourrier and C. Branlant (Laboratoire AREMS, Nancy) for GST-MBNL1 plasmid; N. Sergeant for N1E115 cells. They acknowledge Kyle Tanner and Katriona Laurent-Price for their constant interest and for carefully reading the manuscript. They also thank all the members of the French DM1 network for helpful discussions.

FUNDING

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); Association Française contre les Myopathies (AFM); Paris-Sud University, the AFM and Fondation des Treilles fellowships (to F.X.L.).

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Harper, P.S. (2001) *Myotonic Dystrophy*. W. B. Saunders, London.
- 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.
- 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.
- 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.
- Taneja, K.L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D. and Singer, R.H. (1995) Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J. Cell. Biol.*, **128**, 995–1002.
- 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. USA*, **94**, 7388–7393.
- Holt, I., Mittal, S., Furling, D., Butler-Browne, G.S., Brook, J.D. and Morris, G.E. (2007) Defective mRNA in myotonic dystrophy accumulates at the periphery of nuclear splicing speckles. *Genes Cells*, **12**, 1035–1048.
- Schosser, B. and Timchenko, L. (2010) Myotonic dystrophies 1 and 2: complex diseases with complex mechanisms. *Curr. Genomics*, **11**, 77–90.
- Miller, J.W., Urbinati, C.R., Teng-Ummuay, 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.
- Cass, D.M., Hotchko, R., Barber, P., Jones, K., Gates, D.P. and Berglund, J.A. (2011) The four Zn fingers of MBNL1 provide a flexible platform for recognition of its RNA binding elements. *BMC Mol. Biol.*, **12**, 20.
- O'Rourke, J.R. and Swanson, M.S. (2009) Mechanisms of RNA-mediated disease. *J. Biol. Chem.*, **284**, 7419–7423.
- Ranum, L.P. and Cooper, T.A. (2006) RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu. Rev. Neurosci.*, **29**, 259–277.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol. Cell*, **10**, 35–44.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

21. Garcia-Lopez,A., Monferrer,L., Garcia-Alcover,I., Vicente-Crespo,M., Alvarez-Abril,M.C. and Artero,R.D. (2008) Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in *Drosophila*. *PLoS One*, **3**, e1595.
22. Dansithong,W., Jog,S.P., Paul,S., Mohammadzadeh,R., Tring,S., Kwok,Y., Fry,R.C., Marjoram,P., Comai,L. and Reddy,S. (2011) RNA steady-state defects in myotonic dystrophy are linked to nuclear exclusion of SHARP. *EMBO Rep.*, **12**, 735–742.
23. Rau,F., Freyermuth,F., Fugier,C., Villemain,J.P., Fischer,M.C., Jost,B., Dembele,D., Gourdon,G., Nicole,A., Duboc,D. *et al.* (2011) Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 840–850.
24. Cordin,O., Banroques,J., Tanner,N.K. and Linder,P. (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, **367**, 17–37.
25. Fuller-Pace,F.V. (2006) DEXD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 4206–4215.
26. Janknecht,R. (2010) Multi-talented DEAD-box proteins and potential tumor promoters: p68 RNA helicase (DDX5) and its paralog, p72 RNA helicase (DDX17). *Am. J. Transl. Res.*, **2**, 223–234.
27. Amack,J.D., Paguio,A.P. and Mahadevan,M.S. (1999) Cis and trans effects of the myotonic dystrophy (DM) mutation in a cell culture model. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 1975–1984.
28. Ho,T.H., Savkur,R.S., Poulos,M.G., Mancini,M.A., Swanson,M.S. and Cooper,T.A. (2005) Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy. *J. Cell Sci.*, **118**, 2923–2933.
29. Chaouch,S., Mouly,V., Goyenvallé,A., Vulin,A., Mamchaoui,K., Negroni,E., Di Santo,J., Butler-Browne,G., Torrente,Y., Garcia,L. *et al.* (2009) Immortalized skin fibroblasts expressing conditional MyoD as a renewable and reliable source of converted human muscle cells to assess therapeutic strategies for muscular dystrophies: validation of an exon-skipping approach to restore dystrophin in Duchenne muscular dystrophy cells. *Hum. Gene Ther.*, **20**, 784–790.
30. 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.
31. 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.
32. Ballut,L., Marchadier,B., Baguet,A., Tomasetto,C., Seraphin,B. and Le Hir,H. (2005) The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 861–869.
33. Tran,H., Gourrier,N., Lemercier,C., Dhaenens,C.M., Vautrin,A., Fernandez-Gomez,F.J., Arandel,L., Carpentier,C., Obriot,H., Eddarkaoui,S. *et al.* (2011) Analysis of exonic-regions involved in nuclear localization, splicing activity and dimerization of muscleblind-like-1 isoforms. *J. Biol. Chem.*, **286**, 16435–16446.
34. Sauliere,J., Sureau,A., Expert-Bezancon,A. and Marie,J. (2006) The polypyrimidine tract binding protein (PTB) represses splicing of exon 6B from the beta-tropomyosin pre-mRNA by directly interfering with the binding of the U2AF65 subunit. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 8755–8769.
35. Expert-Bezancon,A., Le Caer,J.P. and Marie,J. (2002) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) K is a component of an intronic splicing enhancer complex that activates the splicing of the alternative exon 6A from chicken beta-tropomyosin pre-mRNA. *J. Biol. Chem.*, **277**, 16614–16623.
36. Dignam,J.D., Lebovitz,R.M. and Roeder,R.G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1475–1489.
37. Sureau,A., Sauliere,J., Expert-Bezancon,A. and Marie,J. (2011) CELF and PTB proteins modulate the inclusion of the beta-tropomyosin exon 6B during myogenic differentiation. *Exp. Cell Res.*, **317**, 94–106.
38. Zhu,C.H., Mouly,V., Cooper,R.N., Mamchaoui,K., Bigot,A., Shay,J.W., Di Santo,J.P., Butler-Browne,G.S. and Wright,W.E. (2007) Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell*, **6**, 515–523.
39. Francois,V., Klein,A.F., Beley,C., Jollet,A., Lemercier,C., Garcia,L. and Furling,D. (2011) Selective silencing of mutated mRNAs in DM1 by using modified hU7-snrRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 85–87.
40. Taneja,K.L. (1998) Localization of trinucleotide repeat sequences in myotonic dystrophy cells using a single fluorochrome-labeled PNA probe. *Biotechniques*, **24**, 472–476.
41. Amack,J.D. and Mahadevan,M.S. (2001) The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1879–1887.
42. Lamm,G.M., Nicol,S.M., Fuller-Pace,F.V. and Lamond,A.I. (1996) p72: a human nuclear DEAD box protein highly related to p68. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3739–3747.
43. 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.
44. Woodson,S.A. (2010) Taming free energy landscapes with RNA chaperones. *RNA Biol.*, **7**, 677–686.
45. Wang,H., Gao,X., Huang,Y., Yang,J. and Liu,Z.R. (2009) P68 RNA helicase is a nucleocytoplasmic shuttling protein. *Cell Res.*, **19**, 1388–1400.
46. Liu,Z.R., Sargueil,B. and Smith,C.W. (1998) Detection of a novel ATP-dependent cross-linked protein at the 5' splice site-U1 small nuclear RNA duplex by methylene blue-mediated photo-cross-linking. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 6910–6920.
47. 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.
48. Day,J.W. and Ranum,L.P. (2005) RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies. *Neuromuscul Disord*, **15**, 5–16.
49. Banroques,J., Cordin,O., Doere,M., Linder,P. and Tanner,N.K. (2008) A conserved phenylalanine of motif IV in superfamily 2 helicases is required for cooperative, ATP-dependent binding of RNA substrates in DEAD-box proteins. *Mol. Cell Biol.*, **28**, 3359–3371.
50. 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.
51. Honig,A., Auboeuf,D., Parker,M.M., O'Malley,B.W. and Berget,S.M. (2002) Regulation of alternative splicing by the ATP-dependent DEAD-box RNA helicase p72. *Mol. Cell Biol.*, **22**, 5698–5707.
52. Charlet,B.N., Logan,P., Singh,G. and Cooper,T.A. (2002) Dynamic antagonism between ETR-3 and PTB regulates cell type-specific alternative splicing. *Mol. Cell*, **9**, 649–658.
53. Kim,D.H., Langlois,M.A., Lee,K.B., Riggs,A.D., Puymirat,J. and Rossi,J.J. (2005) HnRNP H inhibits nuclear export of mRNA containing expanded CUG repeats and a distal branch point sequence. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 3866–3874.
54. Wilson,B.J. and Giguere,V. (2007) Identification of novel pathway partners of p68 and p72 RNA helicases through Oncomine meta-analysis. *BMC Genomics*, **8**, 419.
55. Paul,S., Dansithong,W., Jog,S.P., Holt,I., Mittal,S., Brook,D., Morris,G.E., Comai,L. and Reddy,S. (2011) Expanded CUG repeats dysregulate RNA splicing by altering the stoichiometry of the muscleblind 1 complex. *J. Biol. Chem.*, **286**, 38427–38438.
56. Fukuda,T., Yamagata,K., Fujiyama,S., Matsumoto,T., Koshida,I., Yoshimura,K., Mihara,M., Naitou,M., Endoh,H., Nakamura,T. *et al.* (2007) DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat. Cell Biol.*, **9**, 604–611.
57. Junghans,R.P. (2009) Dystrophin myotonia: why focus on foci? *Eur. J. Hum. Genet.*, **17**, 543–553.
58. Ogilvie,V.C., Wilson,B.J., Nicol,S.M., Morrice,N.A., Saunders,L.R., Barber,G.N. and Fuller-Pace,F.V. (2003)

- The highly related DEAD box RNA helicases p68 and p72 exist as heterodimers in cells. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 1470–1480.
59. 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.
60. Kiliszek, A., Kierzek, R., Krzyzosiak, W.J. and Rypniewski, W. (2010) Atomic resolution structure of CAG RNA repeats: structural insights and implications for the trinucleotide repeat expansion diseases. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 8370–8376.
61. 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. USA*, **106**, 9203–9208.
62. Grammatikakis, I., Goo, Y.H., Echeverria, G.V. and Cooper, T.A. (2011) Identification of MBNL1 and MBNL3 domains required for splicing activation and repression. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 2769–2780.
63. Gates, D.P., Coonrod, L.A. and Berglund, J.A. (2011) Auto-regulated splicing of the muscleblind-like 1 (MBNL1) pre-mRNA. *J. Biol. Chem.*, **286**, 34224–34233.
64. Kar, A., Fushimi, K., Zhou, X., Ray, P., Shi, C., Chen, X., Liu, Z., Chen, S. and Wu, J.Y. (2011) RNA helicase p68 (DDX5) regulates tau exon 10 splicing by modulating a stem-loop structure at the 5' splice site. *Mol. Cell Biol.*, **31**, 1812–1821.
65. Camats, M., Guil, S., Kokolo, M. and Bach-Elias, M. (2008) P68 RNA helicase (DDX5) alters activity of cis- and trans-acting factors of the alternative splicing of H-Ras. *PLoS One*, **3**, e2926.
66. Uhlmann-Schiffler, H., Rossler, O.G. and Stahl, H. (2002) The mRNA of DEAD box protein p72 is alternatively translated into an 82-kDa RNA helicase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 1066–1075.

Legends to supplementary figures

Supplementary Figure S1.

UAP56 and CDC5L do not co-localize with RNA foci. HeLa cells were co-transfected with GFP-UAP56 or GFP-CDC5L expression plasmids and minigenes containing the 3'UTR of *DMPK* gene with 960 CTG repeats (CUG960). Foci were detected by RNA-FISH using Cy3-labeled (CAG)₈ probes. Nuclei were stained with DAPI.

Supplementary Figure S2.

p68-myc colocalizes with CUG repeats in different cell lines. Cells were co-transfected with a myc-p68 expression vector and a minigene containing the 3'UTR of *DMPK* gene with 960 CTG repeats (CUG960). Expression of p68-myc was detected by immunofluorescence using anti-myc antibodies, followed by rabbit anti-mouse A488 antibodies. Foci were detected by RNA-FISH using Cy3-labeled (CAG)₈ probes. Nuclei were stained with DAPI.

Supplementary Figure S3

(A) Schematic representation of wild-type p68 and p68 Δ Ct2. 100 aminoacids from the C-terminus have been deleted. (B) p68-myc Δ Ct2 colocalizes with RNA foci. HeLa cells were co-transfected with p68-myc Δ Ct2 expression plasmid and minigene containing the 3'UTR of *DMPK* gene with 5 CTG (CUG5) or 960 CTG repeats (CUG960). Expression of p68-myc was detected by immunofluorescence using anti-myc antibodies, followed by rabbit anti-mouse A488 antibodies. Foci were detected by RNA-FISH using Cy3-labeled (CAG)₈ probes. Nuclei were stained with DAPI. (C) Overexpressed p68 Δ Ct2 protein has the same splicing activity on TNNT2 exon 5 inclusion as p68 wt. Human myoblast cells were cotransfected with the TNNT2 minigene and with expression vector coding for p68 or p68 Δ Ct2. The histogram shows the quantification of exon 5 inclusion. Results are derived from three experiments with error bars indicating standard deviation. ** $P < 0.01$

Supplementary Figure S4

p68 accelerates the binding of MBNL1 to 95 CUG repeats. (A) Time courses of MBNL1 binding to CUG repeats in the absence or presence of p68. Labeled (CUG)₉₅ RNA were incubated for indicated times with different amounts of recombinant MBNL1 protein with or without a constant amount of recombinant p68 Δ Ct2 (100ng) under splicing conditions with ATP. Proteins crosslinked to labeled RNA were separated on a 10% SDS-PAGE. The results are representative of three independent experiments. (B) Progress curves of MBNL1 binding for one experiment are shown. The radioactivity from labelled crosslinked band was quantified using a PhosphoImager. Open symbols show MBNL1 binding incubated without p68. Closed symbols show MBNL1 binding incubated with p68.

Supplementary Figure S5.

Gel shift experiments on (CUG)₁₄, (CAG)₁₆ and TNNT2 stem-loop structure element. In vitro transcribed (CUG)₁₄, (CAG)₁₆ and TNNT2 RNAs labeled with [α -³²P]CTP were incubated with the indicated amount of recombinant proteins. RNA-protein complexes were separated on native gel electrophoresis. Short CUG and CAG repeats are preferred to the long (CUG)₉₅ and (CAG)₆₂ repeats because RNA-MBNL1 complexes from the long repeats remain in the wells.

Supplementary Figure S6.

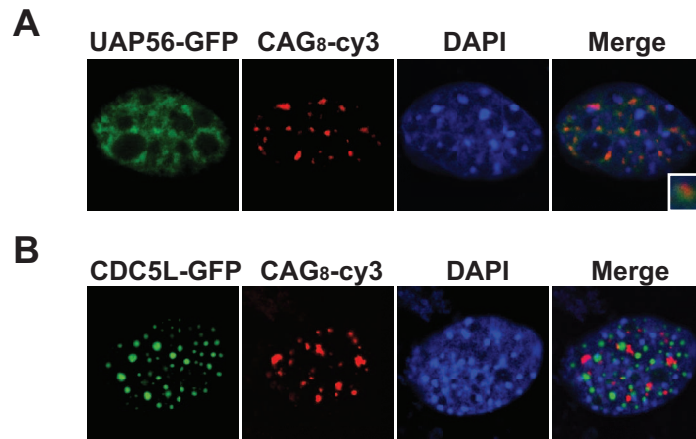
Several different siRNAs that target various regions of p68 or p72 have the same effect on alternative splicing of TNNT2 exon 5. Co-transfection of the TNNT2 minigene in human myoblasts treated with 50 nM of a control siRNA (lane 1), siRNA targeting different regions of p68 or p72 (lanes 3 to 5 and lanes 6 to 8, respectively), the siRNA targeting a common region of p68 and p72 (p68/p72, lane 2) or the siRNA targeting MBNL1 (lane 9). **(A)** Western blot analysis of cells treated with the different siRNAs. Blots were probed with antibodies against p68/DDX5, p72/DDX17, MBNL1 and emerin as a control. Note that polyclonal antibodies against DDX17 recognize the alternative polypeptide p82, which is the result of upstream translation initiation from a non-AUG codon (66). **(B)** RT-PCR analysis of TNNT2 exon 5 inclusion in cells treated with the different siRNAs. The results are from two independent experiments with error bars indicating standard deviation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Supplementary Figure S7

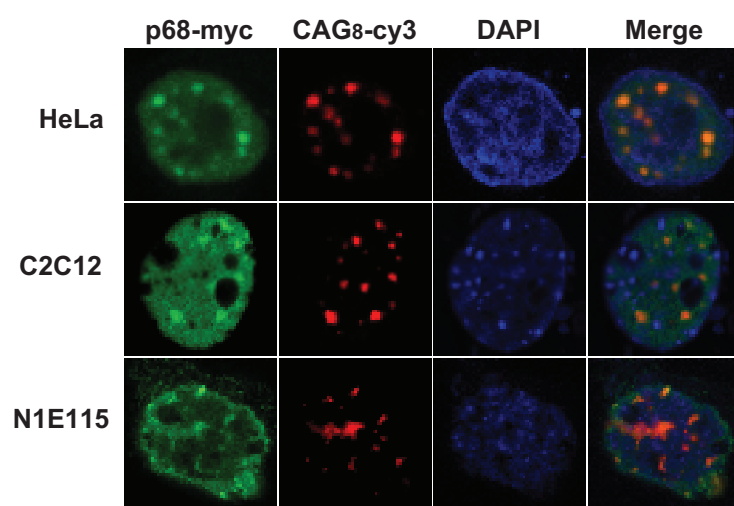
The splicing of TNNT2 exon 5 in DM1 myoblasts is unaffected by the knockdown of p68/p72. **(A)** RT-PCR analysis of endogenous transcripts in DM1 cells transfected with a control siRNA (siLuc) or siRNA against p68 and p72. **(B)** The histogram shows the quantification of exon 5 inclusion. Results are from two independent experiments. **(C)** Western blot analysis of cells treated with the different siRNAs. Blots were probed with antibodies against p68/DDX5, p72/DDX17 and β -actin as a control

66. Uhlmann-Schiffler, H., Rossler, O.G. and Stahl, H. (2002) The mRNA of DEAD box protein p72 is alternatively translated into an 82-kDa RNA helicase. *J Biol Chem*, **277**, 1066-1075.

Supplementary Figure S1

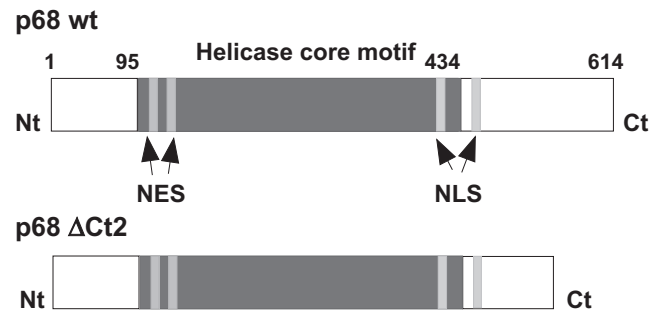


Supplementary Figure S2

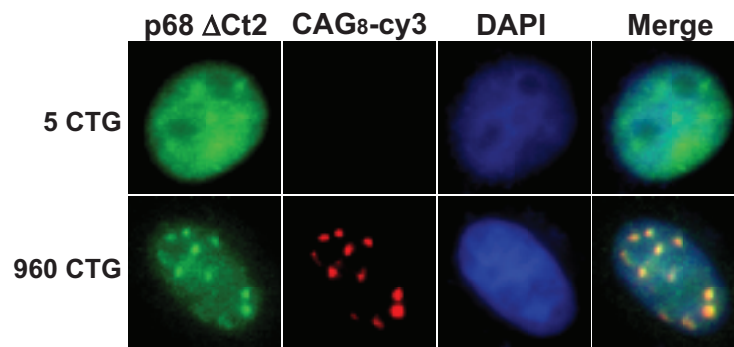


Supplementary Figure S3

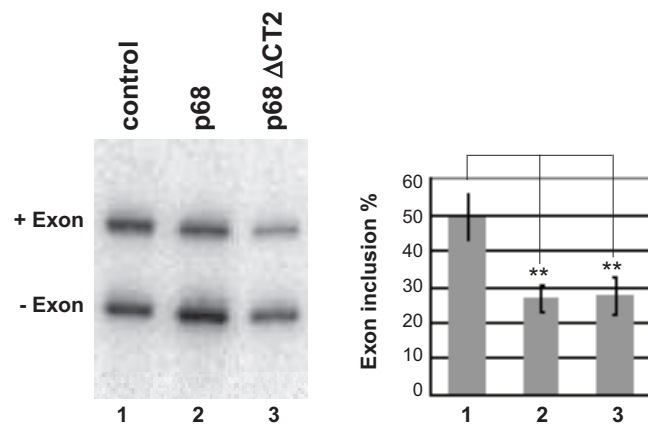
A



B

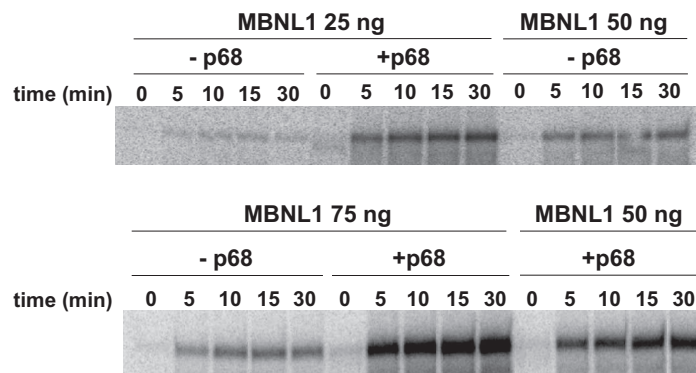


C

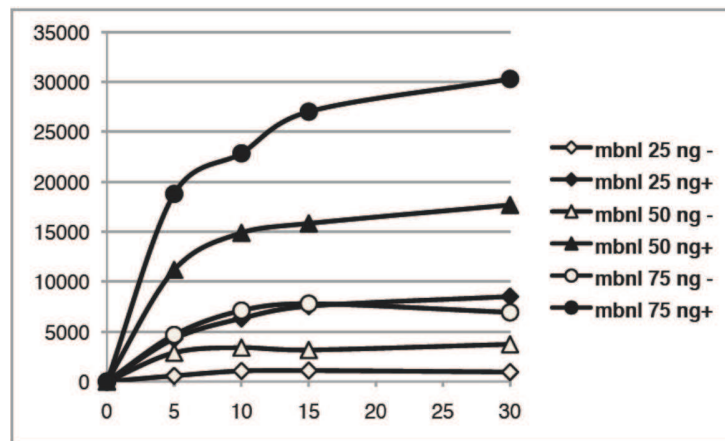


Supplementary Figure S4

A



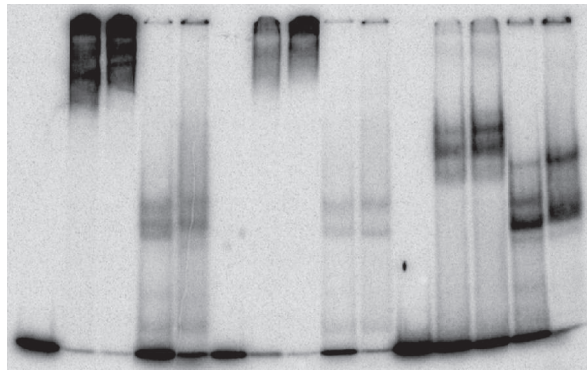
B



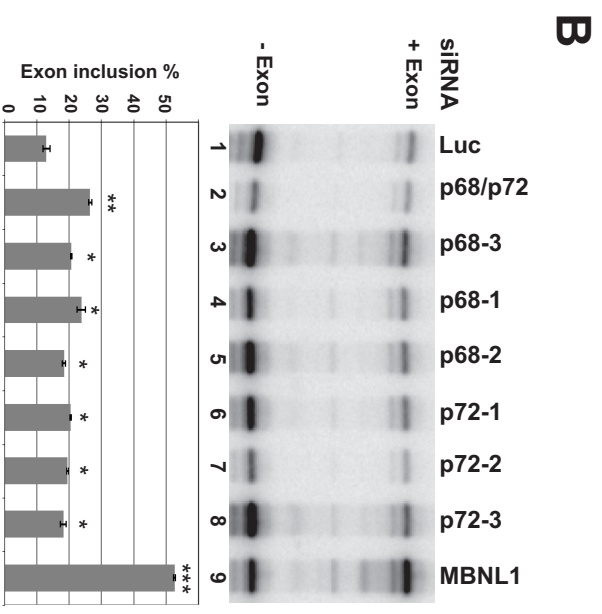
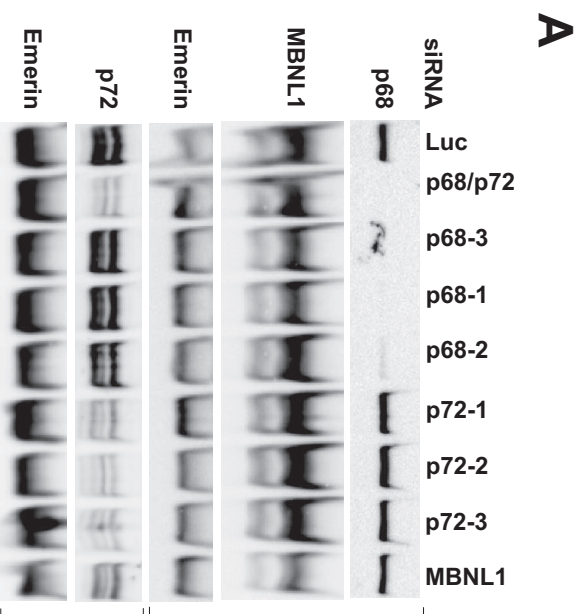
Supplementary Figure S5

	CUG14				CAG16				TNNT2			
r P68 Δ Ct2 (ng)	-	-	-	200 400	-	-	-	200 400	-	-	-	200 400
r MBNL1(ng)	-	300 900	-	-	-	300 900	-	-	-	300 900	-	-

free RNA

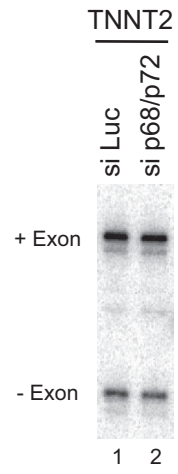


Supplementary Figure S6

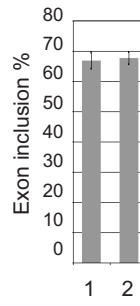


Supplementary Figure 7

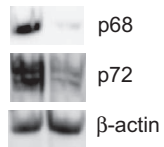
A



B



C



Legends to supplementary tables

Supplementary Table S1.

Proteins identified by mass-spectrometry. Proteins from the fourteen bands are indicated.

Supplementary Table S2.

Proteins tested for colocalization with CUG repeats by FISH/immunofluorescence. Note that some proteins not found in complexes assembled onto CUG repeats have been tested for colocalization because a member identified by mass-spectrometry has known interacting proteins (like proteins for the EJC complex).

Supplementary Table S3.

Sequences of siRNAs and oligonucleotides used for RT-PCR.

Supplementary Table S2

Proteins tested by FISH/immunofluorescence	colocalization
AIMP1	-
cullin 4A	-
CDC5L	-
DDX17	+
DDX5	+
DNA ligase III	-
EML3	-
hnRNP M	-
Ifi204	-
Magoh	-
MBNL	+
NF110c	-
NF110L	-
NF90c	-
NF90L	-
Nucleolin	-
p43	-
PARP-1	-
Pml Scl-100	-
SC35	-
UAP56/DDX39	-
XRCC1	-
Y14	-

Supplementary Table S3

SiRNA (Eurogentec)

siRNA si Luc	CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT
sip68-3	CCGCAACCAUUGACGCCAUdTdT
sip68/p72	GGCUAGAUGUGGAAGAUGUdTdT
sip68-1	UCAAUUAUGACUACCCUAAAdTdT
sip68-2	AUGAAUUCAAACAUGGAAAdTdT
siMBNL1	CACGGAAUGUAAAUUUGCAdTdT
sip72-1	CAAGGGUACCGCCUAUACcdTdT
sip72-2	CAGCAGACUUAUUACAUUdTdT
sip72-3	GAAAGAGAUUGGGUACUUAAdTdT

Oligonucleotides against endogenous genes

TNNT2

sens	5' AAGAGGTGGTGGGAAGAGTAC 3'
antisense	5' AGCCTCCTTTGCTTCCTCTT 3'

INSR

sens	5' AATGCTGCTCCTGTCCAAAG 3'
antisense	5' ACCGTCACATTCCCAACATC 3'

ATP2A1

sens	5'TGGTCCTCAAGATCTCACTG 3'
antisense	5' TAAACAGACACATGACACGG 3'

MBNL1

sens	5' TTGCAAGCCAAGATCAAGGC 3'
antisense	5' CTGTTGTAAGTGCATGTTGG 3'

Minigene

TNNT2 :

sens 5' CATTACCCACATTGGTGTGC 3'

antisense 5' AGGTGCTGCCGCCGGGCGGT 3'