



**HAL**  
open science

# Conséquences pathologiques des expansions CTG sur le système nerveux central d'un modèle murin de la dystrophie myotonique de Steinert : approches moléculaires, protéomiques et cellulaires

Géraldine Sicot

► **To cite this version:**

Géraldine Sicot. Conséquences pathologiques des expansions CTG sur le système nerveux central d'un modèle murin de la dystrophie myotonique de Steinert : approches moléculaires, protéomiques et cellulaires. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05T084 . tel-01059799

**HAL Id: tel-01059799**

**<https://theses.hal.science/tel-01059799>**

Submitted on 2 Sep 2014

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

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

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES / PARIS V  
École Doctorale GC2ID  
(Génétique Cellules Immunologie Infectiologie Développement)

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR EN SCIENCES DE PARIS DESCARTES**

Présentée par  
**Géraldine SICOT**

**Conséquences pathologiques des expansions CTG sur le  
système nerveux central d'un modèle murin de la  
dystrophie myotonique de Steinert : Approches  
moléculaires, protéomiques et cellulaires**

Soutenue publiquement le 24 septembre 2013 devant le jury composé de :

<b>Mme le Dr Geneviève GOURDON</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Mr le Dr Michel VIDAUD</b>	<b>Président du Jury</b>
<b>Mr le Dr Giovanni MEOLA</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Mr le Dr Nicolas SERGEANT</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Mr le Dr Guillaume BASSEZ</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mr le Dr Mario GOMES-PEREIRA</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mme le Dr Cécile MARTINAT</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mr le Dr Laurent SERVAIS</b>	<b>Examineur</b>





## REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord ma famille, mes parents et ma sœur, qui ont du me demander mille fois le sujet de ma thèse, et auxquelles je répondais, non sans lassitude, "oh je travaille sur une maladie génétique ...". J'espère tout de même que dans mes bribes de réponse, vous avez pu cerner le pourquoi du comment de mon travail. Je remercie mes parents pour tout ce qu'ils ont pu m'apprendre, me donner et ce qui fait ce que je suis aujourd'hui.

Je remercie aussi Charles pour avoir accepté de ne pas trop savoir ce qui se tramait au laboratoire. Il est vrai qu'une fois sortie du bâtiment Lamy, Necker ou Broussais, mes pensées quittaient la maladie de Steinert pour d'autres horizons. Je n'étais pas loquace sur ce sujet et laissais toujours ses questions en suspens.

Je remercie les Dr Michel Vidaud, Dr Giovanni Meola, Dr Nicolas Sergeant, Dr Guillaume Bassez, Dr Cécile Martinat et Dr Laurent Servais pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie Geneviève Gourdon pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe.

Je remercie particulièrement Mario Gomes-Pereira pour m'avoir encadrée pendant ces quatre années. Sincèrement, je n'aurai pas pu rêvé avoir meilleur encadrant pour ma thèse. A l'écoute, patient et pédagogue, j'ai beaucoup appris sur le travail de chercheur. L'ensemble de ses remarques et de ses discussions scientifiques ont été très agréables et très enrichissantes. En dehors du laboratoire, nous avons aussi passé d'excellents moments, que je n'oublierai pas.

Je remercie toutes les filles du laboratoire, notamment Aline Huguet, pour son optimisme à toute épreuve et tout simplement pour avoir été là pendant ces quatre années. Je remercie Judith Brouwer pour avoir été une excellente compagnie du soir (et du reste de la journée aussi). J'ai beaucoup apprécié discuter avec elle sur tout et n'importe quoi, allant de la grammaire française, qu'elle maîtrisait sûrement mieux que moi, à l'histoire des cellules HeLa en

passant par le bienfait d'un verre de vin rouge ainsi que des footings à 7h du matin. Je remercie également Annie Nicole pour sa sagesse et ses anecdotes scientifiques. Enfin, je remercie Stéphanie Tomé pour son naturel à toute épreuve et pour les conseils avisés sur la thèse et l'après thèse. Je remercie aussi Fadia Medja pour m'avoir soutenue dans la rédaction, non sans douleur, de ces remerciements, pour être un « petit peu » bordélique ce qui m'a valu de gagner quelques bières, et pour son humour. Je remercie Diana Dinca pour sa fraîcheur et sa joie de vivre, ainsi que Lise Michel et leur souhaite respectivement un excellent début et fin de cheminement vers leurs manuscrits de thèse.

Enfin, je remercie la clique du magistère, Agnès, Berengère, Marine et Vincent, pour leur amitié.

## SOMMAIRE

Liste des abréviations .....	10-12
<b>RESUME</b> .....	<b>13-14</b>
<b>CHAPITRE I. Expansions trinuécléotides et dystrophie myotonique de type 1</b> .....	<b>15-83</b>
<b>I. LES MALADIES A EXPANSIONS DE TRINUCLEOTIDES</b> .....	<b>16-19</b>
I.1. La dynamique des séquences des triplets répétés .....	17-19
I.2. La pathogenèse moléculaire des maladies à triplets répétés .....	19
<b>II. LA DYSTROPHIE MYOTONIQUE DE TYPE 1 : LES CARACTERISTIQUES CLINIQUES</b> .....	<b>20-22</b>
II.1. Les différentes formes de la maladie .....	20-18
II.1.1. La forme tardive .....	20
II.1.2. La forme adulte classique .....	20-21
II.1.3. La forme juvénile ou infantile .....	21
II.1.4. La forme congénitale .....	21
II.2. Les symptômes neurologiques .....	22
<b>III. MECANISMES PATHOLOGIQUES</b> .....	<b>23-45</b>
III.1. La mutation génétique de la DM1 .....	23-24
III.2. Les premiers modèles murins de la DM1 et l'étude de la contribution d'un effet <i>cis</i> de l'amplification CTG sur la pathogenèse moléculaire .....	24-25
III.3. Effet trans .....	25-35
III.3.1. Effet toxique des ARN porteurs des expansions CUG .....	25-27
III.3.2. Interaction protéine/ARN anormale .....	28-33
III.3.2.1. La famille MBNL .....	28-31
III.3.2.2. La famille CELF .....	31-33
III.3.3. Rôle pathologique de la splicéopathie .....	33-35
III.4. DM1, pathologie modèle de la toxicité ARN .....	36-40
III.4.1. Syndrome de l'X fragile avec tremblements et ataxie (FXTAS) .....	36-37
III.4.2. Ataxie spinocérébelleuse (SCAs) de type 8 (SCA8) .....	37-38
III.4.3. La maladie Huntington type 2 (HDL2) .....	38
III.4.3. Autres ataxies spinocérébelleuses: SCA10 et SCA12 .....	39-40
III.5. Autres événements pathologiques .....	40-45
III.5.1. Altération de l'expression génique .....	40-41
III.5.2. Dérégulation du métabolisme des micro ARN .....	41-42
III.5.3. Altération de la traduction .....	42
III.5.4. La transcription bidirectionnelle .....	42-43
III.5.6. La traduction RAN .....	43
III.5.7. Dérégulation de l'activité kinase .....	43-45
<b>IV. STRATEGIES THERAPEUTIQUES</b> .....	<b>45-50</b>
IV.1. Nature réversible du phénotype DM1 .....	46
IV.2. Dégradation des transcrits toxiques porteurs des expansions .....	46-47
IV.3. Compensation de la perte de fonction de MBNL .....	47-49
IV.3.1. Surexpression de MBNL .....	47-48
IV.3.2. Inhibition de l'interaction avec les transcrits ARN toxiques .....	48-49
IV.4. Défi thérapeutique d'aujourd'hui .....	50
<b>V. MECANISMES DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL</b> .....	<b>50-52</b>
V.1. Modifications histopathologiques .....	50-51

V.2. Anomalies de structure .....	51
V.3. Altération métaboliques .....	51
V.4. Anomalies moléculaires .....	51-52
<b>VI. LES SOURIS DMSXL: UN MODELE MULTISYSTEMIQUE DE LA DM1 .....</b>	<b>52-55</b>
VI.1. Le transgène utilisé .....	52
VI.2. Instabilité des répétitions .....	52-53
VI.2. Phénotype multisystémique .....	53-54
<b>VI. CONCLUSION .....</b>	<b>55</b>
Annexe I .....	56-63
Annexe II .....	64-83
<b>CHAPITRE II. Objectifs de ma thèse .....</b>	<b>84-88</b>
<b>I. Etude de la splicéopathie dans le SNC d'un modèle murin de la DM1: les souris DMSXL .....</b>	<b>86-87</b>
<b>II. Etude de l'implication du cervelet dans la neuropathogenèse de la DM1 .....</b>	<b>87</b>
<b>III. Etude de l'homéostasie calcique en réponse à l'expression des expansions CTG .....</b>	<b>87-88</b>
<b>IV. Validation <i>in vitro</i> d'une stratégie thérapeutique de remplacement du facteur d'épissage MBNL1 séquestré par les ARNs toxiques .....</b>	<b>88</b>
<b>CHAPITRE III. Matériels et méthodes .....</b>	<b>89-92</b>
<b>I. MATERIELS CHIMIQUES ET CONSOMMABLES .....</b>	<b>90-9</b>
I.1. Réactifs, poudres ou solutions chimiques .....	90-91
I.2. Solutions pour la culture cellulaire .....	91
I.3. Consommables plastiques et autres .....	91-92
I.4. Kits .....	92
<b>II. MATERIELS EXPERIMENTAUX .....</b>	<b>93-98</b>
II.1. Souris .....	93
II.2. Lignées cellulaires .....	93
II.3. Plasmides .....	93
II.4. Oligonucléotides .....	94-97
II.5. Anticorps .....	98
<b>III. SOLUTIONS .....</b>	<b>99-101</b>
III.1. Solutions générales .....	99-100
III.2. Solutions pour les cultures cellulaires .....	100
III.2.1. Cultures primaires .....	100
III.2.2. Cultures de lignées cellulaires .....	100
III.3. Solutions pour la mesure du flux calcique .....	101

<b>IV. METHODES</b>	<b>101-116</b>
IV.1. Extraction d'ADN	101
IV.2. Génotypage	101-102
IV.3. Détermination de la taille des répétitions	102
IV.4. Caractérisation moléculaire	103-106
IV.4.1. Dissection	103
IV.4.2. Extraction d'ARN	103
IV.4.3. Transcription inverse (RT)	103
IV.4.4. Analyse de l'épissage alternatif	104
IV.4.5. Analyse quantitative en temps réel	104
IV.4.6. Analyse de l'expression protéique	105-106
IV.5. Caractérisation histologique	107-1
IV.5.1. Protocole de perfusion	107
IV.5.2. Hybridation fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	107
IV.5.3. Immunohistochimie (IHC)	108
IV.5.4. Marquage à l'hématoxyline/éosine	108
IV.5.5. Détection des inclusions d'ubiquitine (Ub) et de polyglutamine (PolyQ)	108-9
IV.5.6. Coloration des corps de Nissl	109-110
IV.5.7. Détection de l'apoptose (Tunel assay)	110
IV.5. Cultures cellulaires, transfection et infection	110-112
IV.5.1. Cultures primaires d'astrocytes et de neurones	110-111
IV.5.2. Cultures de lignées cellulaires	111
IV.5.3. Transfection	112
IV.5.4. Infection virale	112
IV.6. Mesure du flux calcique	113
IV.7. Microdissection Capture Laser (LCM)	113-115
IV.8. Quantification globale protéomique : iTRAQ	115-116
IV.9. Analyse statistique	116

## **CHAPITRE IV. Etude de la splicéopathie dans le système nerveux central d'un modèle murin de la DM1, les souris DMSXL** ..... 117-151

### **I. INTRODUCTION: L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DANS LA DM1** ..... 117-119

### **II. RESULTATS** ..... 120-126

#### II.1. Epissage alternatif dans le SNC des souris DMSXL à l'âge d'un mois

 ..... 120-123

    II.1.1. Le cortex frontal et le tronc cérébral ..... 120-122

    II.1.2. L'hippocampe et la moelle épinière ..... 123

#### II.2. Epissage alternatif dans le SNC des souris DMSXL à l'âge de 4 mois

 ..... 124

#### II.3. Validation chez les patients DM1

 ..... 125-126

### **III. DISCUSSION** ..... 127-130

Annexe III ..... 131-144

Annexe IV ..... 145-151

## **CHAPITRE V. Etude de l'implication du cervelet dans la neuropathogenèse de la DM1** ..... 152-206

### **I. INTRODUCTION: LE CERVELET** ..... 153-157

#### I.1. Structure et organisation du cervelet

 ..... 153-156

I.1.1. La population neuronale.....	154-155
I.1.2. La glie de Bergman .....	155-156
I.2. Les fonctions du cervelet.....	156-157
<b>II. RESULTATS.....</b>	<b>157-159</b>
<b>III. DISCUSSION.....</b>	<b>160-165</b>
Annexe V.....	166-206
<b>CHAPITRE VI. Etude de l'homéostasie calcique en présence des expansions CTG.....</b>	<b>207-227</b>
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>208-209</b>
<b>II. RESULTATS.....</b>	<b>210-223</b>
II.1. Investigation du métabolisme ARN anormal : une approche gène candidat.....	210-213
II.2. Approche protéomique globale.....	214-215
II.2.1. Modification post-traductionnelle de l'hippocalcine et de la neurocalcine dans le SNC des souris DMSXL.....	214
II.2.2. Baisse de l'expression de l'Annexin V dans le cervelet des souris DMSXL.....	215
II.3. Caractérisation d'un modèle cellulaire cérébral de la DM1.....	216-222
II.3.1. Différentiation des cultures primaires.....	216-218
II.3.2. Signes de la toxicité des ARNs porteurs des CUG dans les cellules cérébrales primaires des souris DMSXL.....	218-222
II.4. Etude du flux calcique sur un modèle cellulaire de la DM1.....	222-223
<b>III. DISCUSSION.....</b>	<b>224-227</b>
<b>CHAPITRE VII. Validation <i>in vitro</i> d'une stratégie thérapeutique de remplacement du facteur d'épissage MBNL1 séquestré par les ARNs toxiques.....</b>	<b>228-238</b>
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>229-230</b>
<b>II. RESULTATS.....</b>	<b>231-235</b>
II.1. Restauration d'un épissage alternatif par MBNL1 $\Delta$ Cter.....	231-232
II.2. Localisation cellulaire de GFP-MBNL1 $\Delta$ Cter.....	232-234
II.3. Effet de MBNL1 $\Delta$ Cter sur l'expression de <i>DMPK</i> et <i>Dmpk</i> .....	234-235
<b>III. DISCUSSION.....</b>	<b>236-238</b>
<b>CHAPITRE VIII. CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>239-246</b>
<b>I. LE MODELE ANIMAL.....</b>	<b>240-241</b>
<b>II. LE MECANISME DE LA MALADIE.....</b>	<b>241-242</b>

<b>III. UNE NOUVELLE REGION CEREBRALE SUR LA CARTE DE LA DM1 .....</b>	<b>242-243</b>
<b>IV. DEREGLATION DU METABOLISME DU GLUTAMATE.....</b>	<b>243</b>
<b>V. LE CALCIUM DANS LA DM1 .....</b>	<b>243-244</b>
<b>VI. LES THERAPIES ENVISAGEABLES .....</b>	<b>244-245</b>
<b>CHAPITRE IX. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>247-264</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

°C	Degré Celsius
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ALS	Sclérose latérale amyotrophique
APP	<i>Amyloid Beta (A4) Precursor Protein</i>
APS	Amonium persulfate
AREs	AU-rich elements
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP2A1	<i>ATPase, Ca<sup>++</sup> Transporting, Cardiac Muscle, Fast Twitch 1</i>
ATXN8	<i>Ataxin 8</i>
ATXN10	<i>Ataxin 10</i>
ATXN8OS	<i>Ataxin 8 Opposite Strand</i>
BET	Bromure d'éthidium
BIN1	<i>Bridging Integrator 1</i>
bp	Paire de bases
BRUNOL	<i>Bruno (Drosophila)-like, RNA binding protein</i>
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcium
CELF	<i>CUG-BP/ETR-3-like family</i>
cf	<i>confer</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-Propanesulfonate hydrate
CLCN1	<i>Chloride Channel, Voltage-Sensitive 1</i>
cm	Centimètre
CTCF	CCCTC-binding factor
CUGBP	<i>CUGBinding Protein</i>
Da	Dalton
DAPI	Di Aminido Phenyl Indol
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
DM	Dystrophie myotonique
DM1	Dystrophie myotonique de type 1
DM2	Dystrophie myotonique de type 2
DMAHP	<i>DM locus-AssociatedHhomeodomain Protein</i>
DMPK	<i>Dystrophia Myotonica protein kinase</i>
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DMWD	<i>Dystrophia Myotonica containing WD repeat motif</i>
DPX	Distyrene / plasticizer / xylene
DROSHA	<i>Drosha, Ribonuclease Type III</i>
DTT	Dithiothréitol
EAAT2	<i>Excitotoxic Amino Acid Transporter 2</i>
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ETR	<i>ELAV-Type RNA-Binding Protein</i>
FBS	Fœtal bovine serum
FMR1	Fragile X Mental Retardation 1
FRDA	Ataxie de Friedreich
FXR1	<i>Fragile X Mental Retardation, Autosomal Homolog 1</i>
FXTAS	Syndrome du X fragile avec tremblement et ataxie
G	Gauge
GFAP	<i>Glial Fibrillary acid protein</i>

GFP	Green Fluorescent Protein
Glu	L-glutamate
GLT1	Glutamate transporter 1
GRIN	Glutamate Receptor, Ionotropic, N-Methyl D-Aspartate
h	Heure
H <sub>2</sub> O	Eau
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Acide chlorhydrique
HD	Maladie de Huntington (chorée de Huntington)
HDAC	Histone deacetylase
HDL2	Maladie de Huntington type 2 (chorée de Huntington type 2)
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HNRNP	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein
HSA	Human Skeletal Actin
Hsp70	Heat shock protein 70KDa
IDMC	International myotonic dystrophy consortium
INSR	Insulin receptor
i.p.	intra péritonéale
JPH3	Junctophilin-3
k	Kilo
KCl	Chlorure de potassium
KO	Knock-out
LCM	Laser capture microdissection
LDB3	LIM Domain Binding 3
LR	Long repeats
mA	Milli ampère
MAP2	Microtubule Associated Protein 2
MAPT	Microtubule-Associated Protein Tau
MBNL	Muscleblind-Like
miARN/miR	Micro acide ribonucléique
min	Minute
MEF2A	Myocyte enhancer factor 2A
mg	Milli gramme
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
mL	Milli litre
µg	Micro gramme
µL	Micro litre
µm	Micro mètre
µM	Micro molaire
MMLV	Moloney murine leukemia virus
MMR	Méthyl directed Mismatch Repair
MSH	MutS Homolog
N/A	Non applicable
N/D	Non déterminé
NaCl	Chlorure de sodium
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonate de sodium
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sodium dihydrogen phosphate
ng	Nano gramme
NGS	Normal goat serum
NKX2-5	NK2 Homeobox 5
nm	Nano mètre
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate

NMDAR	<i>N-Methyl-D-Aspartate Receptor</i>
NT	Non transgénique
OAS	Oligonucléotide antisens
PAF	Paraformaldéhyde
PBS	phosphate buffered saline
PC	Cellule de Purkinje
PCR	Polymerase chain reaction
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PLT	Potentialisation à long-terme
PPP2R2B	<i>Protein Phosphatase 2, Regulatory Subunit B, beta</i>
PURA	<i>Purine-Rich Element Binding Protein A</i>
QI	Quotient intellectuel
qsp	Quantité suffisante pour
RAN	Repeat-associated non-ATG-mediated
RAR $\gamma$	<i>Retinoic Acid Receptor, Gamma</i>
RNase	Ribonucléase
SCA	Ataxie spinocérébelleuse
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sec	Seconde
SERCA1	<i>Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase 1</i>
SEM	Standard error mean (erreur type)
siARN	Petit acide ribonucléique interférant
SIX5	<i>Sine Oculis Homeobox Homolog 5</i>
SLC1A2	<i>Solute Carrier Family 1 Member 2</i>
SLITRK	<i>SLIT And NTRK-Like</i>
SNC	Système nerveux central
SP1	<i>Specificity Protein 1 transcription factor</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
T <sup>°</sup> <sub>hyb</sub>	Température d'hybridation
TA	Température ambiante
TBST	Tris-Buffered Saline with Tween 20
TBE	Tris borate EDTA
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TNNT2/cTNT	<i>Troponin T type 2 (cardiac)</i>
U	Unités
u.a.	unités arbitraires
UTR	Untranslated region
V	Volt

## RESUME

La dystrophie myotonique de type I (DM1) constitue la plus fréquente des pathologies musculaires héréditaires chez l'adulte. Bien qu'elle ait été initialement considérée comme une maladie musculaire, la DM1 présente une atteinte neurologique très handicapante. Cette maladie autosomique dominante résulte de l'expansion anormale d'un triplet CTG dans la partie 3'UTR du gène *DMPK*. Plusieurs événements moléculaires de la DM1 sont régis par un effet *trans* du transcrite *DMPK* muté. Cet effet toxique entraîne une dérégulation de l'épissage alternatif dans de nombreux tissus. Malgré des avancées récentes dans la compréhension de la pathogenèse de la maladie dans le muscle et le système nerveux central (SNC), les mécanismes moléculaires et cellulaires de la DM1 dans le cerveau restent encore peu compris. Afin de disséquer ce mécanisme pathologique, notre laboratoire a créé des souris transgéniques exprimant le transcrite *DMPK* avec de larges expansions CUG dans de nombreux tissus, comme le SNC. Ces souris nommées DMSXL, recréent d'importants aspects pathologiques de la DM1, notamment des anomalies du comportement et électrophysiologiques du cerveau. Elles représentent donc un excellent outil pour explorer l'effet pathologique de la mutation dans le SNC.

En m'appuyant sur ce modèle, j'ai exploré dans un premier temps l'effet *trans* des ARNs toxiques et l'ampleur de la splicéopathie dans le SNC. J'ai mis en évidence des défauts d'épissage dans le cortex frontal, le tronc cérébral, l'hippocampe, la moelle épinière et le cervelet des souris DMSXL, ainsi que dans certaines régions du cerveau des patients DM1. De façon intéressante, certains défauts d'épissage sont régions spécifiques, et ne montrent pas d'aggravation avec l'âge des souris DMSXL. Mes résultats démontrent que les ARNs mutés sont capables de déréguler l'épissage alternatif dans l'ensemble du SNC.

La région du cervelet a aussi montré des anomalies de l'épissage dans les souris DMSXL, qui, en plus, présentent des perturbations cognitives dépendantes de cette région cérébrale. Le cervelet des souris DMSXL présente aussi des déficits électrophysiologiques suggérant une dysfonction cérébelleuse et plus précisément une dysfonction des cellules de Purkinje. Dans la recherche des populations cellulaires les plus affectées dans le cervelet, j'ai démontré la présence de signes de la toxicité de l'ARN plus marqués dans la glie de Bergman, entourant les cellules de Purkinje. Pour trouver les voies moléculaires perturbées dans le cervelet, et disséquer le mécanisme derrière les anomalies du comportement et électrophysiologiques observées, j'ai réalisé une approche protéomique globale et trouvé une sévère baisse de l'expression du transporteur glial de glutamate GLT1/EAAT2, probablement liée à l'activation anormale de PKC par l'expression des transcrits *DMPK* amplifiés. Ces résultats suggèrent une dysfonction du cervelet, en conséquence d'un possible métabolisme anormal du glutamate, qui perturberait les interactions glie/neurone et le bon fonctionnement des cellules de Purkinje.

L'analyse protéomique globale du cerveau des souris DM1 a aussi identifié des différences d'expression et des modifications post-traductionnelles de plusieurs protéines impliquées dans la signalisation du calcium. L'étude du métabolisme des ARNm dans la DM1 a mis en évidence la dérégulation de l'épissage de gènes impliqués dans le métabolisme du calcium, soutenant l'hypothèse d'une dysfonction calcique dans le SNC dans la DM1. Pour étudier les conséquences de l'expression des ARNs toxiques sur les variations calciques cellulaires, j'ai caractérisé un modèle cellulaire astrocytaire de la DM1. Ce modèle m'a permis de démontrer une localisation anormale du récepteur GRIN1/NMDAR1, ainsi qu'une réponse calcique anormale dans les astrocytes primaires porteurs des amplifications CTG.

Malgré les avancées thérapeutiques dans le muscle, on ne sait pas à quel point les stratégies en cours de développement sont efficaces dans le SNC. Pour étudier ce problème, j'ai utilisé le modèle astrocytaire de la DM1 afin de valider *in cellulo* une stratégie thérapeutique qui vise à rétablir une activité normale du facteur d'épissage MBNL1 endogène. J'ai démontré que cette stratégie est efficace pour corriger certains événements moléculaires de la DM1 dans les cellules cérébrales en culture. Il serait intéressant par la suite d'étudier son impact sur les symptômes neurologiques.

Mes travaux de thèse ont permis d'avancer dans la compréhension de la neuropathologie de la DM1. Ils ont mis en évidence pour la première fois une dysfonction du cervelet, ainsi que la possible dérégulation de la voie calcique dans le SNC. Mes résultats ont donc contribué à mieux comprendre le mécanisme de la DM1 dans le SNC, pour, à long terme, développer des approches thérapeutiques ciblant des événements moléculaires précis.

**Mots-clés :** dystrophie myotonique, système nerveux central, souris transgéniques, cervelet, calcium.

## SUMMARY

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is the most frequent inherited muscular disorder in adults. Although traditionally regarded as a muscle disease, DM1 presents debilitating neurological manifestations. DM1 is an autosomic dominant disease caused by the abnormal expansion of a CTG triplet within the 3'UTR of the *DMPK* gene. Many molecular aspects of the DM1 are mediated by a *trans* effect of the expanded *DMPK* transcripts, whose accumulation leads to splicing deregulation in many tissues. Despite recent progress in the understanding of DM1 pathogenesis in muscle and central nervous system (CNS), the detailed molecular disease mechanism operating in the brain is still poorly understood. In order to investigate the pathophysiology of the disease, our laboratory has generated DMSXL transgenic mice expressing *DMPK* transcripts containing large CUG expansions in many tissues, such as the CNS. DMSXL mice mimic important features of the DM1, notably in the CNS, showing behaviour as well as electrophysiological abnormalities. Therefore, this mouse line represents an excellent tool to investigate the toxic effects of the mutation in the CNS.

Taking advantages of this transgenic model, I have first explored the *trans* effect of the toxic RNA and the extent of DM1-associated spliceopathy in the CNS. I have found splicing defects of relevant genes in the frontal cortex, the brainstem, the hippocampus, the spinal cord and the cerebellum of DMSXL mice, which were validated in some brain regions of DM1 patients. Interestingly, some splicing defects were region-specific, and their severity did not increase with the age of the DMSXL mice. My data demonstrate that CUG-containing RNAs have a wide deleterious effect and deregulate alternative splicing in many areas of the CNS.

In addition to splicing abnormalities in cerebellum, DMSXL mice also displayed deficits in cerebellum-dependant motor coordination. Plus, DMSXL cerebellum showed electrophysiological abnormalities, suggesting cerebellar dysfunction and more precisely Purkinje cell dysfunction. In the search for the cellular populations showing the greatest susceptibility to RNA toxicity in the cerebellum, I have found extensive foci accumulation as well as pronounced splicing defects in the Bergman glia, surrounding Purkinje cells, in DMSXL and DM1 patients cerebellum. In order to identify molecular pathways and mechanisms behind the behaviour and electrophysiological abnormalities detected, I have performed a global proteomics approach and found a severe decrease in the expression of a glial glutamate transporter GLT1/EAAT2, probably linked to the abnormal PKC activation by the expression of expanded *DMPK* transcripts. Taken together, these data suggest DM1 causes cerebellum dysfunction, through abnormal glutamate metabolism and the disruption of glia/neurons communication, and in particular the interaction between the Bergman glia and Purkinje neurons.

Global proteomic analysis of DMSXL cerebellum also identified expression and post-translational changes of several proteins involved in calcium signalling. Missplicing of different transcripts involved in calcium metabolism reinforces the idea of calcium dysfunction in the neuropathogenesis of the DM1. To study the effects of toxic RNA on calcium homeostasis and flux, I have established and characterised a brain cell model of DM1. DMSXL primary astrocyte cultures allowed me to show the mislocalisation of the glutamate receptor GRIN1/NMDAR1, as well as abnormal calcium responses to stimulation.

Despite recent therapeutic advances in muscle, we do not know the CNS efficiency of the therapeutic strategies currently being developed. To address this problem, I have used the DM1 astrocyte cell model to validate *in cellulo* a therapeutic strategy aiming to restore the activity of the endogenous splicing factor MBNL1. I have shown that this approach is efficient in cerebral cells in culture. It would then be very interesting to assess the functional impact of this strategy on the amelioration of mouse neurological symptoms.

My thesis work provided a significant step in the understanding of the DM1 pathology in the CNS. My results revealed for the first time signs of cerebellum dysfunction in DM1, as well as signs of calcium homeostasis deregulation in the SNC. My work contributed to better understand the pathological mechanisms of DM1, the brain pathways and cell types most susceptible to toxic RNA. In the long term, my data will contribute to the rational development of therapeutic strategies targeting precise and deleterious molecular events.

**Key words:** myotonic dystrophy, central nervous system, transgenic mice, cerebellum, calcium.

## CHAPITRE I.

# Expansions trinuéotides et dystrophie myotonique de type 1

### RESUME |

La molécule d'ARN mutée peut être toxique pour les cellules, causant alors des pathologies par un mécanisme dominant agissant en *trans*. La toxicité ARN a été décrite pour la première fois dans la DM1, une maladie multisystémique causée par une expansion anormale d'un triplet répété non codant. Le développement de multiples et complémentaires modèles animaux nous a permis de mieux comprendre le mécanisme complexe médié par cette toxicité ARN, qui touche non seulement les muscles et le cœur mais aussi le système nerveux central. En effet, de plus en plus d'études montrent l'implication non-négligeable du SNC dans la pathogenèse de la DM1. Mais cette toxicité ARN n'est pas restreinte à la DM1 et touche un nombre croissant de maladies, qui partagent alors certains événements moléculaires toxiques, à l'image de l'accumulation des ARNs mutés et de la dérégulation des protéines de liaison à l'ARN. Les progrès remarquables dans la dissection du mécanisme nous permettent d'envisager différentes stratégies thérapeutiques qui sont aujourd'hui testées sur les modèles animaux.

Annexe I (Sicot et al., 2011)

Annexe II (Sicot and Gomes-Pereira, 2013)

« The thing grows and repeats itself throughout your lifetime, and the severity of the symptoms multiply as it passes through generations. The type that my niece got from my sister is worse than the type my sister got from my dad. The age of onset of symptoms gets steadily younger, although you can only inherit the congenital form, like my niece has, from your mother. So my dad's symptoms are appearing now that he's in his sixties, my sister and brother are developing problems in their thirties and my niece and nephew have problems all the way from childhood.

**Which means that three years ago we knew nothing, and now it's kicking in for them all at the same time.**” Jacqueline Donachie extrait de DM 2002

Le témoignage de cette parente de patients DM1 résume très bien la complexité de la dystrophie myotonique de Steinert, une pathologie à expansion de triplets répétés, qui en quelques années s'imposent à une famille. Ce chapitre introductif traitera donc des maladies à triplets répétés, et plus particulièrement de la dystrophie myotonique de Steinert ou de type 1 (DM1), et abordera ses aspects cliniques, génétiques et physiopathologiques.

## I. LES MALADIES A EXPANSIONS DE TRINUCLEOTIDES

Il y a maintenant plus de 20 ans, en 1991, les séquences nucléotidiques anormalement répétées étaient découvertes comme étant responsables d'un certain nombre de maladies neuromusculaires et neurologiques, à l'image du syndrome de l'X fragile ou du syndrome de Kennedy (Fu et al., 1991 ; La Spada et al., 1991 ; Oberle et al., 1991 ; Verkerk et al., 1991), pathologies décrites il y a plus de 100 ans pour certaines. La majorité d'entre elles sont associées à des expansions de trinucleotides, mais aussi de tétranucleotides (dystrophie myotonique de type 2 : DM2) ou de pentanucleotides [ataxie spinocérébelleuse (SCA) de type 10 : SCA10].

Ces mutations sont très polymorphiques et présentent un seuil pour la taille des expansions, au dessus duquel les répétitions ont des conséquences pathologiques. En effet, de manière générale, le nombre de ces répétitions varie entre 5 et 50 chez les individus sains et reste stable au cours des générations. Au delà du seuil pathologique, spécifique à chaque maladie à répétitions de nucléotides, les expansions dynamiques deviennent instables et ont une forte tendance à l'amplification. Typiquement, la taille des répétitions augmente de générations en générations et est directement corrélée avec la sévérité de la maladie et indirectement avec l'âge d'apparition de la maladie. Une fois le seuil pathologique dépassé, les séquences nucléotidiques répétées augmentent en taille d'une génération à la suivante, qui présentera alors une forme plus grave de la maladie à un âge plus

précoce que la génération précédente : c'est le phénomène d'anticipation, caractéristique de la plupart des maladies à triplets répétés (Harper et al., 1992). À côté de cette instabilité intergénérationnelle et pour certaines de ces pathologies à expansions de triplets, il existe une instabilité somatique entre les différents tissus mais aussi au sein d'un même tissu. La mosaïque intertissulaire, c'est à dire la variation du nombre de motifs répétés entre les différents tissus, est généralement associée à des phénotypes tissu-spécifiques. C'est à dire, les tissus les plus atteints dans la maladie, sont souvent ceux qui présentent une taille plus importante des triplets répétés. La progression de la mosaïque intratissulaire, ou accumulation des tailles de répétitions plus importantes au sein d'un même tissu, est associée à l'aggravation des symptômes avec la progression de l'âge (Gomes-Pereira and Monckton, 2006 ; Lopez Castel et al., 2010 ; McMurray, 2010).

### **I.1. La dynamique des séquences des triplets répétés**

Plusieurs processus semblent être impliqués dans le mécanisme à l'origine de l'instabilité intergénérationnelle et somatique. Un des premiers mécanismes proposés dans l'instabilité est le dérapage ou « slippage » de la fourche de réplication pendant la réplication. Ce modèle était initialement basé sur l'étude de l'instabilité des triplets répétés dans des organismes simples, comme les bactéries et la levure (Samadashwily et al., 1997 ; Pelletier et al., 2003). Les bases non appariées vont former une boucle de mésappariement, générant des expansions ou contractions lors de la prochaine réplication, selon que la boucle se situe sur le brin nouvellement synthétisé ou sur le brin matrice (Kunkel, 1993 ; Liu and Leffak, 2012 ; Strand et al., 1993). Il a été observé que l'ADN polymérase *in vitro* (Petruska et al., 1998) ou bien la fourche de réplication chez *E.coli* ou dans la levure (Samadashwily et al., 1997 ; Pelletier et al., 2003) avaient des difficultés au niveau des répétitions de triplets à fort contenu G/C. Cela suggère une perturbation de la réplication de l'ADN à l'origine de l'instabilité. Des études plus récentes ont permis de mettre en évidence l'implication des éléments de la réplication de l'ADN dans le phénomène d'instabilité dans des cellules de mammifères (Pearson et al., 2005). En effet, l'étude de cultures cellulaires utilisant des fibroblastes de fœtus DM1 a montré une expansion des (CTG)<sub>216</sub> dans les cellules prolifératives et non dans les cellules quiescentes suggérant ainsi que la perturbation de la dynamique de la fourche de réplication joue un rôle dans l'instabilité (Yang et al., 2003). L'instabilité des expansions CTG a aussi été étudiée dans un modèle *ex vivo* d'astrocytes humains immortalisés (Claassen and Lahue, 2007). Les répétitions (CTG)<sub>25</sub> portées par un plasmide ont pu être amplifiées par le système de réplication des astrocytes. Un



système de sélection des plasmides, dont les répétitions CTG ont été amplifiées, a permis d'observer un phénomène d'instabilité biaisée vers les expansions dans cette population astrocytaire (Claassen and Lahue, 2007).

Cependant, le dérapage de la polymérase ne peut pas expliquer tous les aspects de l'instabilité, notamment l'instabilité dans les cellules post-mitotiques du cerveau (Kennedy and Shelbourne, 2000) et du muscle (Monckton et al., 1995). Un autre processus cellulaire important pouvant aussi participer à l'instabilité des expansions CTG est la réparation de l'ADN, là pour maintenir la stabilité et l'intégrité du génome. Différents modèles d'études ont permis de mettre en évidence le rôle des protéines du système de réparation des mésappariements de bases (MMR ou *Mismatch Repair*) dans l'instabilité des triplets répétés. Dans le complexe MMR, les hétérodimères formés par MSH2 (MutS Homolog 2) associées à soit MSH6 (MutS Homolog 6), soit MSH3 (MutS Homolog 3), peuvent reconnaître respectivement de petites délétions/insertions de 1 à 2 nucléotides ou de grandes boucles d'insertions/délétions de 2 à 8 nucléotides (Marti et al., 2002). Pour mieux comprendre l'implication du complexe MMR dans le phénomène d'instabilité, des modèles murins exprimant des séquences CAG•CTG instables ont été croisés avec des lignées déficientes pour certains gènes du MMR. De manière étonnante, l'absence de *Msh2*, *Msh3* et *Pms2* (*Postmeiotic Segregation Increased 2*), a stabilisé les expansions, pouvant même induire un biais vers les contractions (Foiry et al., 2006 ; Gomes-Pereira et al., 2004 ; Manley et al., 1999 ; Savouret et al., 2003 ; van Den Broek et al., 2002). Ces données impliquent donc l'activité des protéines fonctionnelles du MMR dans le phénomène d'instabilité. Il est possible que ces protéines ne soient pas capables de réparer les structures secondaires formées par les séquences répétées, entraînant une réparation erronée de l'ADN qui résulte en une augmentation de la taille du trinuécléotide (Gomes-Pereira and Monckton, 2006).

D'autres mécanismes de la réparation de l'ADN, la réparation par excision de bases (BER) ou la réparation par excision de nucléotides (NER) peuvent aussi participer à l'instabilité des expansions (Hubert et al., 2011; Jung and Bonini, 2007 ; Kovtun et al., 2007 ; Lin and Wilson, 2007). Cependant, le rôle exact de chacune des protéines de ces systèmes de réparation de l'ADN dans le processus d'instabilité des triplets reste méconnu.

Enfin, plusieurs autres paramètres peuvent modifier et influencer l'instabilité des séquences des trinuécléotides répétés, à l'image de leur taille, leur séquence et la présence d'interruptions, les séquences avoisinantes et le contexte génomique (Brock et al., 1999 ; Libby et al., 2003), leur niveaux de transcription (Goula et al, 2012 ; Lin et al., 2006) ainsi que des facteurs épigénétiques (Cleary and Pearson, 2003 ; Filippova et al., 2001 ; Pearson et al., 2005).

Il semble donc que le mécanisme de l'instabilité des triplets répétés implique la participation de plusieurs événements cellulaires et intermédiaires moléculaires. A présent, il est difficile de distinguer la contribution individuelle de chacun.

## I.2. La pathogénèse moléculaire des maladies à triplets répétés.

Plusieurs mécanismes de pathogénèse moléculaire peuvent être en cause dans les maladies à triplets répétés, faisant le lien entre la mutation et l'apparition des symptômes. Les mécanismes en jeu dépendent de la localisation des trinucleotides répétés au sein du gène touché (Figure I.1). Parmi eux : (1) perte de fonction du gène muté lorsque l'expansion touche une région non-codante du gène [ex. : ataxie de Friedreich (FRDA)] ; (2) gain de fonction protéique toxique lorsque l'expansion touche une région codante affectant la séquence et donc la fonction protéique [ex. : chorée de Huntington (HD)] ; (3) gain de fonction ARN, lorsque les expansions touchent une région non-codante, comme les parties 5' UTR [ex. : syndrome de l'X fragile (FRAXA)], 3' UTR [ex. : dystrophie myotonique de type 1 (DM1)], ou les séquences introniques [ex. : ataxie de Friedreich (FRDA)]; (4) combinaison de plusieurs mécanismes (ex. : SCA8) (Gatchel and Zoghbi, 2005 ; Lutz, 2007 ; Orr and Zoghbi, 2007 ; Takahashi et al., 2010). Ce chapitre détaillera particulièrement le mécanisme gain de fonction ARN, dont la DM1 en est le paradigme.

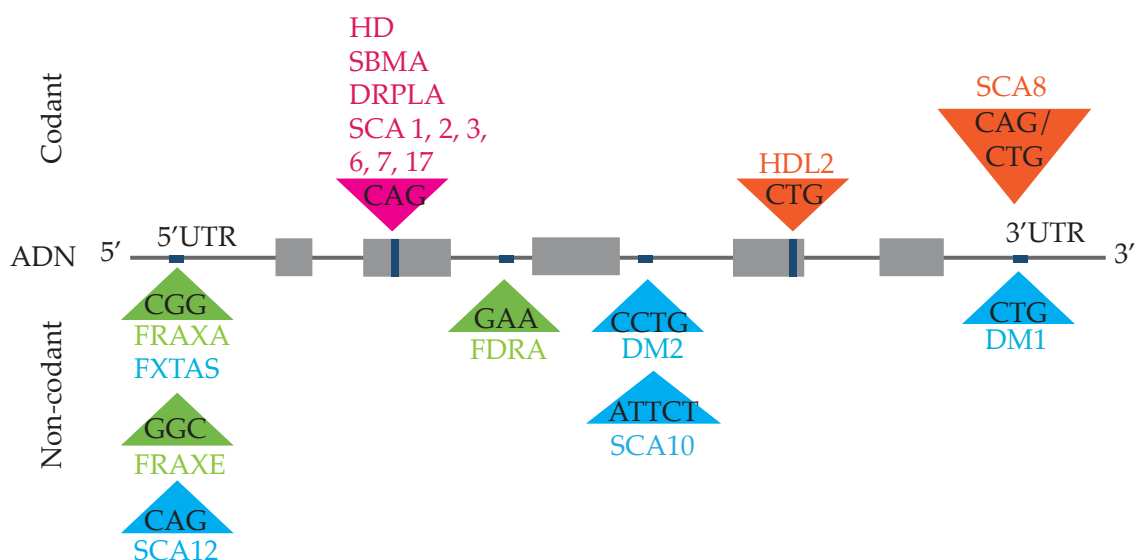


Figure I.1. Localisation des séquences répétées pathologiques au sein du gène. L'effet de la mutation est différent selon le type et la localisation des séquences : gain de fonction protéique en **rose**, gain de fonction ARN en **bleu**, combinaison de différents mécanismes en **orange**, perte de fonction en **vert**.

## **II. LA DYSTROPHIE MYOTONIQUE DE TYPE 1 : LES CARACTERISTIQUES CLINIQUES**

La dystrophie myotonique de Steinert ou de type 1 (DM1) est la forme la plus commune de dystrophies musculaires chez l'adulte, avec une personne affectée sur 8000 dans le monde (Harper, 1998). C'est une maladie rare dont la prévalence peut varier de un cas sur 100 000 au Japon jusqu'à un cas sur 500 dans des régions spécifiques telles que le nord-est du Québec (Turner and Hilton-Jones, 2010 ; Yotova et al., 2005). Elle touche aussi bien les hommes que les femmes, mais l'expression des symptômes est très variable d'une personne à l'autre, même au sein d'une même famille. En plus de son extrême variabilité phénotypique, elle est caractérisée par un phénomène d'anticipation très marqué, défini par une apparition plus précoce et une sévérité plus importante des symptômes au cours des générations (Harper et al., 1992). On distingue ainsi différentes formes selon les signes cliniques et leurs âges d'apparition (Figure II.1).

### **II.1. Les différentes formes cliniques de la maladie**

#### **II.1.1. La forme tardive**

Cette forme est assez bénigne puisque les patients âgés portent l'anomalie génétique mais ne manifestent presque aucun symptômes. La myotonie et la faiblesse musculaire sont rarement présents. Une calvitie précoce chez l'homme et une cataracte bilatérale précoce avec la présence de granules polychromes scintillants sont parfois les seuls signes cliniques.

#### **II.1.2. La forme adulte classique**

Cette forme est de nature multisystémique, à l'image de la pathologie. Elle est la plus répandue et se déclare autour de 30 et 40 ans. Elle se caractérise par un pattern musculaire bien précis. Une myotonie musculaire est fréquemment observée. Cela consiste en des spasmes toniques des muscles dus à l'incapacité de relaxation après une contraction volontaire. S'y ajoute une faiblesse des muscles distaux, des muscles superficiels du visage et du cou. Enfin, le diaphragme, les muscles intercostaux et ceux oculaires externes sont souvent atteints. Des troubles de la conduction cardiaque peuvent s'associer à ces symptômes et sont la cause fréquente de mort chez les patients DM1. Le témoignage des malades souligne aussi une atteinte neurologique très handicapante, à l'image des troubles du sommeil. Des

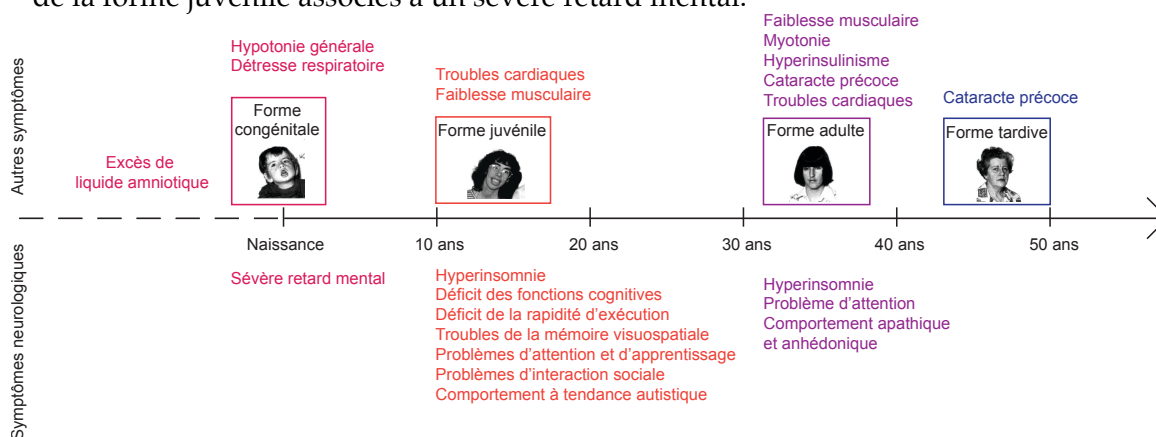
troubles cognitifs dans cette forme sont très variables (Gaul et al., 2006 ; Van Spaendonck et al., 1995), mais les patients présentent souvent des difficultés d'apprentissage, d'interaction sociale, un comportement anhédonique et apathique. Une cataracte précoce, avant l'âge de 40 ans, est une autre caractéristique, tout comme une dérégulation endocrinienne aboutissant à une hyperinsulinémie qui peut entraîner un diabète de type deux et à une atrophie testiculaire chez les mâles.

### II.1.3. La forme juvénile ou infantile

Cette forme peut débuter dès l'âge de 10 ans et les patients vont dans un premier temps développer des troubles neurologiques et cardiaques. En plus des symptômes présents dans la forme adulte, les enfants vont parfois avoir des quotients intellectuels (QI) réduits, voire un léger retard mental. Ils vont également présenter un déficit des fonctions cognitives, un déficit dans la rapidité d'exécution et dans la mémoire visuo-spatiale. Certaines études retrouvent aussi un comportement autistique chez certains enfants DM1 (Angeard et al., 2007 ; Angeard et al., 2011 ; Ekstrom et al., 2008).

### II.1.4. La forme congénitale

C'est la forme la plus sévère de la pathologie à début anténatal (Harley et al., 1992). Dès la grossesse, un excès de liquide amniotique peut être observé. A la naissance, le bébé présente une hypotonie générale, des troubles de succion et de déglutition ainsi qu'une détresse respiratoire, qui peut être à l'origine de son décès. Si l'enfant survit, il développera par la suite et de manière plus sévère les symptômes de la forme juvénile associés à un sévère retard mental.



**Figure II.1. Représentation schématique des différentes formes cliniques de la DM1.** Les illustrations des patients de la forme congénitale, juvénile, adulte et tardive illustrent très bien le phénomène d'anticipation, et le continuum qui existe entre les différentes formes cliniques de la maladie. Les principaux symptômes cliniques sont indiqués pour chaque forme, et repartie en symptômes neurologiques (en bas) et autres symptômes (en haut). Ce schéma montre l'importance des symptômes neurologiques dans les formes plus précoces de la maladie.

## II.2. Les symptômes neurologiques

Depuis maintenant quelques années, des études cliniques et neuropsychologiques ont prouvé l'implication du système nerveux central dans la pathologie, spécialement dans les formes les plus sévères de la maladie, renforçant l'idée que la DM1 est aussi une pathologie neurologique. Un des grands traits cliniques de la DM1 est l'hypersomnie. Les patients atteints de la forme adulte présentent, de manière très variable, un excès de sommeil durant la journée suggérant une dérégulation des centres contrôles du sommeil (Romigi et al., 2011 ; Rubinsztein et al., 1998 ; Yu et al., 2011a). De manière variable, certains patients vont développer des déficits cognitifs, des difficultés d'apprentissage, un manque d'initiative, un comportement apathique et des traits de comportement compulsif et obsessionnel. Ils vont aussi présenter un caractère anhédonique, caractérisé par une difficulté à ressentir des émotions positives et plaisantes. Un tiers des patients présentant une forme adulte classique a un QI réduit comparé aux contrôles, et la majorité d'entre eux présentent une dysfonction exécutive (Meola et al., 2003). Une fonction cognitive sociale altérée associée à une dysfonction de la théorie de l'esprit, qui est la capacité spécifique à comprendre l'état mental et émotionnel d'un autre individu, a aussi été détectée chez les patients DM1 avec une forme adulte (Kobayakawa et al., 2012). L'atteinte neurologique est encore plus importante dans les formes plus précoces de la maladie. Les patients DM1 avec une forme juvénile ont des difficultés à l'école, et sont donc fréquemment classés comme ayant un retard mental. Ils sont diagnostiqués avec une hyperactivité et des difficultés d'attention, ainsi que des problèmes émotionnels et comportementaux, symptômes qui peuvent apparaître avant l'atteinte musculaire (Steyaert et al., 1997 ; Steyaert et al., 2000). Les formes congénitales sont elles caractérisées par un retard mental pouvant aller de modéré à sévère, alors que la forme infantile est caractérisée par un QI plus bas, ainsi qu'un déficit dans l'exécution (Angeard et al., 2007). En général, les manifestations neurologiques de cette pathologie ont des conséquences délétères sur les patients DM1 et leur famille (de Leon and Cisneros, 2008 ; Meola et al., 2003 ; Peric et al., 2012). Leurs difficultés cognitives ont pour conséquence une faible réussite scolaire ainsi que dans le milieu du travail, un environnement familial peu stimulant, mais aussi un manque social et économique. Ces anomalies neurologiques sont donc hautement handicapantes et ont un fort impact négatif sur la qualité de vie des patients (Gagnon et al., 2010 ; Laberge et al., 2007 ; Peric et al., 2012).

### III. MECANISMES PATHOLOGIQUES

#### III.1. La mutation génétique de la DM1

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est une maladie héréditaire à transmission autosomique dominante dont le défaut génétique fut seulement caractérisé en 1992 (Brook et al., 1992 ; Fu et al., 1992 ; Mahadevan et al., 1992), presque 100 ans après sa description clinique (Steinert, 1909). Elle est caractérisée par l'expansion anormale des triplets CTG dans la partie non codante 3'UTR du gène *DMPK* (*Dystrophia myotonica protein kinase*), localisé en q13.3 du chromosome 19, entre le gène *DMWD* (*Dystrophia Myotonica containing WD repeat motif*) et *SIX5/DMAHP* (*Sine Oculis Homeobox Homolog 5/DM locus-associated homeodomain protein*) (Figure III.1) (Groenen et al., 2000). Le gène *DMPK*, qui code une protéine kinase de type sérine/thréonine, est impliqué dans la dynamique du cytosquelette, l'homéostasie calcique, et la physiologie musculaire (Kaliman and Llagostera, 2008). Des modèles murins transgéniques ou cellulaires invalidés pour *DMPK* démontre qu'elle est impliquée dans l'organisation du muscle squelettique (Reddy et al., 1996) ainsi que dans la différenciation des myoblastes (Furling et al., 2001). Il existe un deuxième type de DM dont la cause génétique est l'expansion anormale du tétranucléotide CCTG (Liquori et al., 2001) au niveau de l'intron 1 du gène *CNBP/ZNF9* (*CCHC-type zinc finger, nucleic acid-binding protein*), localisé sur le chromosome 3.

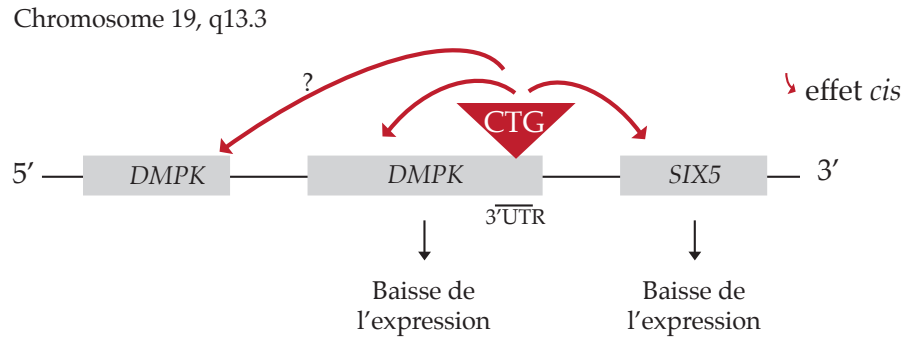
Dans la population normale, le nombre de CTG est polymorphe et varie de 5 à 37 répétitions. Chez les patients atteints de DM1, ce nombre dépasse le seuil de 50 répétitions, est instable au cours des générations et biaisé vers les expansions. Il peut alors atteindre jusqu'à 4000 répétitions dans la forme la plus sévère de la maladie (la forme congénitale), illustrant la relativement bonne corrélation entre la taille des répétitions et la sévérité des symptômes.

Le phénomène d'anticipation, préalablement défini, est particulièrement marqué dans cette pathologie et expliqué par une forte instabilité intergénérationnelle fortement biaisée vers les expansions (Harper et al., 1992). Le nombre de répétitions transmis varie à la fois selon la taille de la répétition et le sexe du parent transmetteur. En effet, lorsque les répétitions sont <100 CTG chez le parent transmetteur, l'amplification à la génération suivante est plus grande si la transmission est paternelle. En revanche, si cette taille dépasse 500, on tend vers une diminution de la taille si la transmission est paternelle, mais vers une augmentation pour des transmissions maternelles à l'origine des formes congénitales (Brunner et al., 1993 ; Lavedan et al., 1993).

Le nombre de répétitions des triplets peut être très instable au sein des tissus somatiques d'un même individu (mosaïque intertissulaire). De façon intéressante, il a été observé que le nombre d'expansions était plus important dans le tissu musculaire, le cerveau, les testicules et le foie comparativement aux cellules leucocytaires (Thornton et al., 1994). Au sein d'un même organe, une grande variabilité peut aussi être décrite (mosaïque intratissulaire), à l'image du muscle et du cerveau, où l'hétérogénéité tissulaire de la taille des CTG peut varier de 300 à plus de 3000 répétitions d'une région cérébrale à une autre (Anvret et al., 1993 ; Ashizawa et al., 1993 ; Jansen et al., 1994 ; Lavedan et al., 1993 ; Monckton et al., 1995 ; Sergeant et al., 2001). Etant donné que les tissus les plus atteints par la maladie (ex. : muscles et SNC), présentent souvent une mosaïque somatique plus importante, caractérisée par l'accumulation de très grandes amplifications CTG, il a été suggéré que l'instabilité tissu spécifique pourrait contribuer à la variabilité phénotypique de la maladie (Gomes-Pereira and Monckton, 2006). C'est à dire, il a été proposé que le tissu, au sein duquel le triplet CTG augmente de taille plus rapidement, atteindrait un seuil pathologique plus tôt et développerait des symptômes de façon plus précoce. La progression de l'instabilité somatique au cours de la vie du patient DM1, et l'accumulation d'une variabilité des tailles CTG de plus en plus importante pourraient contribuer à l'aggravation des symptômes avec l'âge des individus.

### **III.2. Les premiers modèles murins de la DM1 et l'étude de la contribution d'un effet *cis* de l'amplification CTG sur la pathogenèse moléculaire.**

Les premières hypothèses mécanistiques de la DM1 se sont orientées vers un effet *cis* de la mutation, responsable de l'altération de l'expression du gène *DMPK* et des gènes *DMWD* et *SIX5*, respectivement en 5' et 3' de *DMPK* (Figure III.1) (Groenen and Wieriga, 1998). Une baisse de la transcription du gène muté *DMPK* et des gènes voisins *SIX5* et *DMWD* avait en effet été observée chez les patients DM1 (Fu et al., 1993 ; Thornton et al., 1997). Les triplets CTG constituent un site de liaison pour les nucléosomes. La présence des expansions favoriserait localement la formation de ces derniers et donc la compaction de l'ADN en hétérochromatine (Otten and Tapscott, 1995 ; Wang et al., 1994). Il en résulterait une inhibition de la transcription du gène voisin *SIX5* et possiblement de *DMPK* qui entrainerait l'apparition des symptômes de la maladie.



**Figure III.1 Représentation des effets *cis* des expansions CTG localisées en 3'UTR du gène *DMPK* localisé sur le chromosome 19 en q13.3, avec en 5' le gène *DMWD* et en 3' *SIX5*.**

La génération des modèles transgéniques a fortement aidé la compréhension du mécanisme de la DM1 (Sicot et al., 2011 ; Sicot and Gomes-Pereira, 2013 ; Gomes-Pereira et al., 2011). L'hypothèse de l'haploinsuffisance des gènes du locus DM1 a été testée grâce au développement de souris *knock-out* (KO). Les souris déficientes pour *Dmpk* n'ont développé qu'une légère myopathie et des anomalies cardiaques (Berul et al., 1999 ; Jansen et al., 1996 ; Reddy et al., 1996). De même, des souris déficientes pour *Six5* n'ont développé qu'une cataracte (Klesert et al., 2000 ; Sarkar et al., 2000). L'altération de l'expression de ces deux gènes par les expansions CTG ne semble pas être capable à elle seule d'expliquer la sévérité des symptômes, ni l'apparition de la myotonie, un symptôme capital de la DM1. Ces résultats montrent que l'effet *cis* ne joue pas un rôle majeur dans les mécanismes de la maladie.

### III.3. Effet *trans* de l'amplification CTG sur la pathogenèse moléculaire

Les similarités entre les anomalies cliniques et moléculaires entre la DM1 et la DM2 ont orienté les hypothèses mécanistiques vers un rôle de l'ARN, porteur des expansions non-codantes respectivement CUG et CCUG. Dans les deux conditions, des transcrits d'ARN sont retenus dans le noyau formant des agrégats ARN ou foci (Davis et al., 1997 ; Liquori et al., 2001 ; Taneja et al., 1995). Ces accumulations d'inclusions ribonucléaires dans la DM1 et la DM2 ont fortement suggéré un gain de fonction anormal des ARNs toxiques porteurs des répétitions, appelé effet *trans* de la mutation.

#### III.3.1. Effet toxique des ARNs porteurs des expansions CUG

Une deuxième génération de modèles murins transgéniques a été créée, exprimant les répétitions (CTG)<sub>n</sub> non-codantes toxiques. Ces modèles ont permis de



mieux comprendre le mécanisme de la pathologie et le rôle *trans*-dominant des ARNs contenant les répétitions toxiques CUG (Tableau III.1).

Le modèle murin *HSA*<sup>LR</sup> exprime, dans les muscles squelettiques, le transcrit *human skeletal actin* (*HSA*) contenant environ 250 répétitions CTG au sein de la partie 3'UTR. Ce modèle a donc permis d'étudier l'effet *trans* des expansions CTG non-codantes au sein des muscles squelettiques. L'expression du transcrit toxique dans les muscles squelettiques résulte en un phénotype sévère, incluant une forte mortalité, une myotonie et une myopathie (Mankodi et al., 2000). L'expression de ces répétitions toxiques a aussi pour conséquence la séquestration de MBNL1 au sein des inclusions ribonucléaires. Ce modèle a clairement démontré les conséquences délétères des répétitions CTG sur les muscles squelettiques indépendamment du contexte génomique environnant. Cependant, l'absence de faiblesse musculaire prononcée dans ces souris suggère un rôle des séquences non répétitives, de la partie 3'UTR du gène *DMPK*, avoisinantes des répétitions CTG. De plus, compte-tenu de l'expression tissu spécifique du transgène, la toxicité potentielle des répétitions CTG dans d'autres tissus restait à être démontrée.

Caractéristiques génétiques	Principal phénotype	Principales caractéristiques moléculaires	Implications	Références
Expression des CTG non-traduites dans les muscles squelettiques.	Myotonie et légère myopathie	Foci d'ARN, séquestration de MBNL et défauts d'épissage	Répétitions CUG non-codantes toxiques pour les muscles indépendamment du contexte environnemental	(Mankodi et al., 2000)
Expression multisystémique du transcrit humain <i>DMPK</i> contenant les expansions CTG	Légère myotonie, progressive faiblesse musculaire, dysfonction synaptique	Foci d'ARN, séquestration de MBNL, défauts d'épissage modérés	Répétitions CUG non-codantes délétères dans un grand nombre de tissus et d'organes	(Guiraud-Dogan et al., 2007 ; Hernandez-Hernandez et al., 2013a ; Hernandez-Hernandez et al., 2013b ; Huguet et al., 2012 ; Seznec et al., 2001)
Expression inductible des répétitions CTG non-traduites au sein de l'exon 15 du gène <i>Dmpk</i>	Myotonie, progressive dégénérescence musculaire, défauts de conduction cardiaque	Foci d'ARN, séquestration de MBNL, surexpression de CELF1, défauts d'épissage	Toxicité des répétitions CUG tissu spécifique	(Orengo et al., 2008; Wang et al., 2007)
Surexpression inductible et réversible de courtes répétitions CTG	Myotonie, défauts de conduction cardiaques	Histopathologie, surexpression de CELF1, surexpression de NKX2-5	Caractère réversible de la toxicité ARN et du phénotype DM1	(Mahadevan et al., 2006)

**Tableau III.1. Principaux modèles murins de la DM1 exprimant les expansions CUG.** Le tableau présente leurs caractéristiques génétiques, leurs phénotypes et leurs implications dans la compréhension du mécanisme de la pathologie. Adapté de (Sicot and Gomes-Pereira, 2013).

L'impact multisystémique des expansions CTG a été illustré par les souris transgéniques DM300, exprimant le transcrit humain *DMPK* en entier contenant de 300 à 600 répétitions dans de nombreux tissus, sous le contrôle du promoteur humain (Seznec et al., 2001). Grâce à l'instabilité intergénérationnelle des répétitions CTG fortement biaisée vers les expansions dans ces souris, la lignée transgénique possède aujourd'hui plus de 1000 répétitions et est nommée DMSXL (Gomes-Pereira et al., 2007 ; Seznec et al., 2001). Les souris transgéniques homozygotes produisent assez d'ARN toxique pour développer un phénotype musculaire (myotonie, myopathie, faiblesse musculaire progressive), des signes d'une tauopathie dans le système nerveux central comparable aux observations faites chez l'homme, un métabolisme anormal du glucose, un retard de croissance, une forte mortalité et des problèmes respiratoires (Guiraud-Dogan et al., 2007 ; Huguet et al., 2012 ; Panaite et al., 2008 ; Seznec et al., 2001). A cause de la taille des CTG plus importante, les souris DMSXL ont développé un phénotype plus marqué que les souris DM300, caractérisé par une mortalité plus élevée, des déficits moteurs, des anomalies du comportement et une dysfonction synaptique (Gomes-Pereira et al., 2007 ; Hernandez-Hernandez et al., 2013a ; Huguet et al., 2012). Le phénotype marqué des souris homozygotes par rapport aux souris hémizygotés de la même lignée, ainsi que l'aggravation du phénotype avec la taille croissante des expansions CTG, montre que le niveau d'expression du transcrit ARN et la taille des répétitions sont deux facteurs déterminants dans la pathologie. D'un point de vue moléculaire, l'accumulation du transcrit *DMPK* porteur des expansions CUG au sein des foci nucléaires dans de nombreux tissus est associée à la séquestration des protéines MBNL1 et MBNL2 dans les muscles et le cerveau. De plus, une surexpression des protéines CELF1 et CELF2 a été détectée dans le cerveau des souris DMSXL (Hernandez-Hernandez et al., 2013 ; Huguet et al., 2012).

Enfin, d'autres éléments, nous permettant de mieux comprendre le rôle pathologique des expansions CTG dans plusieurs tissus, sont venus d'un modèle murin inductible, exprimant 960 répétitions CTG interrompues et non-codantes au sein de l'exon 15 du gène *DMPK*. L'expression du transgène dans le cœur des souris, dites EpA960, a résulté en un phénotype DM1 cardiaque prononcé, incluant de sévères arythmies (Wang et al., 2007). L'expression du transgène dans les muscles squelettiques a résulté également en un phénotype DM1, incluant une myotonie, une faiblesse musculaire progressive et des anomalies histopathologiques (Orengo et al., 2008). Ces défauts cardiaques et musculaires sont associés à l'accumulation nucléaire des foci d'ARN, la séquestration de MBNL1 et la surexpression de CELF1 et CELF2 (Orengo et al., 2008 ; Wang et al., 2007).

L'accumulation de l'ARN sous forme de foci dans la DM1 et la DM2, ainsi que le phénotype des modèles murins exprimant les expansions CUG, au sein du gène *DMPK* ou dans un autre gène, a clairement démontré l'effet délétère des expansions CUG dans la DM1 et argumentent alors en faveur d'un mécanisme pathologique médié par la toxicité ARN.

### III.3.2. Interaction protéine/ARN anormale

La génération de modèles DM1 animaux a aussi permis de mieux comprendre le mécanisme *trans* des répétitions toxiques CTG médié par l'accumulation nucléaire du transcrit *DMPK* porteurs des expansions toxiques sous forme de foci, suggérant un gain de fonction des ARNs toxiques. A cette accumulation nucléaire est associée la dérégulation de protéines de liaison aux motifs CUG. Parmi elles, deux grandes familles régulatrices de l'épissage alternatif au cours du développement: la famille muscleblind like (MBNL) et la famille CUG-binding protein et ETR-3 like factors (CELF), toutes deux affectées par les expansions CUG. En effet, pendant que les protéines MBNL sont déléetées du cytoplasme et du nucléoplasme en conséquence de la séquestration par les inclusions ribonucléaires (Fardaei et al., 2001 ; Fardaei et al., 2002 ; Miller et al., 2000), les protéines de la famille CELF, qui ne co-localisent pas avec les foci d'ARN, voient leur expression et leur activité augmentées chez les patients DM1, due à une stabilisation par hyperphosphorylation, médiée par la voie PKC (Kuyumcu-Martinez et al., 2007 ; Timchenko et al., 1996 ; Wang et al., 2009).

#### III.3.2.1. La famille MBNL

Cette famille se compose de protéines liant l'ARN et hautement conservées entre les espèces (Artero et al., 1998 ; Begemann et al., 1997 ; Kanadia et al., 2003b ; Pascual et al., 2006). Chez l'homme, la famille MBNL se compose de 3 protéines homologues: MBNL1, MBNL2 et MBNL3, dont l'organisation génomique a de fortes similarités (Fardaei et al., 2002). MBNL1 et MBNL2 ont une expression ubiquitaire bien que prédominante dans le muscle, le cœur et le cerveau adulte. Quant à MBNL3, elle est principalement exprimée dans le placenta, bien que des traces aient été détectées dans d'autres tissus. Au cours du développement, l'expression de MBNL3 diminue alors que celle de MBNL1 et MBNL2 augmente (Fardaei et al., 2002 ; Kanadia et al., 2003b).

Les protéines MBNL sont identifiées comme facteurs d'épissage, impliquées dans la régulation d'une fraction de transcrits soumis à un programme d'épissage

régulé au cours du développement (Kalsotra et al., 2008 ; Lin et al., 2006). Concernant la fonction d'épissage de MBNL1, il a été montré que MBNL1 était capable de se lier à des motifs YGCY (où Y est une pyrimidine) présents sur l'ARN double brin (Ho et al., 2004) et plus particulièrement aux expansions CUG (Fardaei et al., 2002). Ainsi, MBNL1 a été identifiée capable de se lier *in vitro* aux (CUG)<sub>n</sub> (Miller et al., 2000), puis *in vivo* dans des cellules musculaires et neuronales de patients DM1 (Fardaei et al., 2001 ; Jiang et al., 2004 ; Mankodi et al., 2001). Puis, ce fut le cas de MBNL2 et de MBNL3 (Fardaei et al., 2002). Par conséquent, la localisation de ces protéines au niveau des *foci* sous formes d'inclusions nucléaires entraînent leurs déplétions du nucléoplasme et donc leurs impossibilités à réguler l'épissage alternatif de leurs transcrits cibles. C'est le cas pour la troponine cardiaque *TNNT2/cTNT*, le récepteur à l'insuline *INSR* et le canal chlore *CLCN1* dérégulés dans la DM1 (Philips et al., 1998 ; Savkur et al., 2001).

Afin de mieux identifier les conséquences de la déplétion nucléoplasmique des protéines MBNL1, MBNL2 et MBNL3 indépendamment des expansions CTG, différents modèles murins invalidés pour ces protéines ont été créés (Tableau III.2).

Les souris *Mbnl1*<sup>3/3</sup> expriment une isoforme de *Mbnl1*, incapable de lier le motif CUG, recréant ainsi la situation DM1 où les isoformes de MBNL1, anormalement séquestrées au sein de foci ribonucléaires, deviennent fonctionnellement indisponibles. Ces souris ont développé une myotonie (Kanadia et al., 2003a), des défauts de conduction cardiaque ainsi qu'une apathie et un manque de motivation (Matynia et al., 2010 ; Suenaga et al., 2012). Ajoutés à ce phénotype, des défauts d'épissage sont également observés dans les muscles squelettiques et le cœur, ainsi qu'au niveau du cerveau (Kanadia et al., 2003a ; Suenaga et al., 2012). Ces résultats sont cohérents avec le rôle pathologique de la séquestration de MBNL1 et sa perte de fonction dans de nombreux tissus. Cependant, l'inactivation de *Mbnl1* ne reproduit pas toutes les caractéristiques de la pathologie, et d'autres données expérimentales ont suggéré que des protéines additionnelles de la famille de MBNL jouent aussi un rôle dans le mécanisme moléculaire de la DM1. En effet, en plus de MBNL1, MBNL2 et MBNL3 co-localisent aussi avec les expansions CUG (Fardaei et al., 2002), et peuvent jouer un rôle dans les événements pathologiques de la maladie, suggérant un effet combinatoire de la perte de fonction de plusieurs protéines MBNL.

Les données expérimentales concernant l'implication de MBNL2 dans la pathogenèse musculaire de la DM1 ont tout d'abord été un peu controversées. Alors qu'une lignée murine inactivée pour *Mbnl2*, par l'insertion d'un vecteur viral au sein du quatrième exon, ne présentait aucun phénotype pathologique évident (Lin et al., 2006), une autre lignée inactivée pour *Mbnl2* par l'insertion d'un gène rapporteur

neomycin/ $\beta$ -galactosidase au sein du premier exon, a développé un phénotype musculaire, incluant une myotonie, des anomalies histologiques et des défauts d'épissage dans les muscles (Hao et al., 2008). A la suite de ces résultats contradictoires, un troisième modèle murin inactivé pour *Mbnl2*, par disruption du second exon par recombinaison homologue, a été généré, et a montré un rôle prédominant de l'inactivation de *Mbnl2* dans le système nerveux central. Ces souris ont montré des défauts d'épissage importants, des troubles du sommeil, des déficits cognitifs, incluant un déficit de la mémoire spatiale et de l'apprentissage suite à la réalisation d'une tâche dépendante de l'hippocampe, une potentialisation à long terme (PLT) altérée et des anomalies de la transmission synaptique dépendante du récepteur NMDA (Charizanis et al., 2012). Les différentes stratégies de mutagenèse utilisées pour la génération de ces trois modèles, ainsi que le fond génétique, peuvent contribuer aux différences phénotypiques observées entre les différents modèles inactivés pour *Mbnl2*.

Enfin, l'implication de MBNL3 dans le mécanisme moléculaire de la DM1 a été étudiée via la création d'un modèle murin qui n'exprime pas l'isoforme majeure nucléaire de *Mbnl3*, reproduisant ainsi l'inactivation fonctionnelle de MBNL3 observée dans la DM1 où MBNL3 est anormalement séquestrée au sein des foci ribonucléaires (Poulos et al., 2013). Ces souris déficientes pour *Mbnl3* ont montré des anomalies de la régénération musculaire ainsi que de la fonction musculaire. Ces données expérimentales suggèrent que la perte de fonction de MBNL3 est un facteur contribuant à la faiblesse musculaire progressive observée dans la DM1.

Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus avec des modèles murins inactivés pour les gènes *Mbnl* montrent que, pendant que la protéine MBNL1 serait un facteur d'épissage et un intermédiaire important dans la maladie au niveau des muscles, MBNL2 jouerait un rôle plus prédominant dans le système nerveux central, alors que MBNL3 serait impliquée dans la faiblesse musculaire progressive observée chez les patients DM1.

Modèle animal	Caractéristiques génétiques	Principal phénotype	Principales caractéristiques moléculaires	Implications	Références
<i>Mbnl1</i> KO	Absence des isoformes de MBNL liant les répétitions CUG	Myotonie, cataracte, apathie et défauts de motivation, histopathologie	Défauts d'épissage	L'inactivation de MBNL1 induit un phénotype DM1	(Kanadia et al., 2003a; Matynia et al., 2010; Suenaga et al., 2012)
<i>Mbnl2</i> KO	Disruption du second intron du gène murin <i>Mbnl2</i> via l'insertion de la construction Neo-LacZ	Myopathie et myotonie	Défauts d'épissage, histopathologie	Rôle controversé de l'inactivation de <i>Mbnl2</i> dans la pathologie au sein des muscles	(Hao et al., 2008)
	Disruption du gène via l'insertion du vecteur rétroviral GT dans le quatrième intron du gène murin <i>Mbnl2</i>	Phénotype normal	N/D	Toxicité des répétitions CUG tissu spécifique	(Lin et al., 2006)
	Disruption de l'exon 2 du gène murin <i>Mbnl2</i> par recombinaison homologue	Anomalies du sommeil, défauts cognitifs, susceptibilité accrue aux crises épileptiques	Défauts d'épissage dans le cerveau	Perte de fonction de MBNL2 induit un phénotype DM1 dans le système nerveux central	(Charizanis et al., 2012)
<i>Mbnl3</i> KO	Disruption de l'exon 2 du gène murin <i>Mbnl3</i> via l'insertion de la construction Neo-LacZ	Anomalies de la régénération musculaire et des fonctions musculaires	Modestes changements de l'épissage, histopathologie	Perte de fonction de MBNL3 contribue à la faiblesse musculaire	(Poulos et al., 2013)
Surexpression de CELF1	Surexpression constitutive de CELF1 dans les muscles squelettiques	Développement altéré des muscles, forte mortalité	Histopathologie	Surexpression de CELF1 provoque des anomalies de développement (rôle dans les cas congénitaux de la DM1 ?)	(Timchenko et al., 2004)
	Surexpression de CELF1 dans les muscles squelettiques et le cœur	Mortalité néonatale, histopathologie, altération du développement	Défauts d'épissage		(Ho et al., 2005)
	Surexpression conditionnelle de CELF1	Hypertrophie cardiaque, cardiomyopathie, mortalité	Défauts d'épissage	Surexpression de CELF1 dans les muscles squelettiques et le cœur est suffisante pour recréer quelques uns des phénotypes de la pathologie	(Koshelev et al., 2010)

**Figure III.2. Principaux modèles murins de la DM1 exprimant des niveaux anormaux des régulateurs d'épissage.** Le tableau présente leurs caractéristiques génétiques, leurs phénotypes et leurs implications dans la compréhension du mécanisme de la pathologie. N/D : non déterminé. Adapté de (Sicot and Gomes-Pereira, 2013).

### III.3.2.2. La famille CELF

Ces protéines, au nombre de 6 (CELF 1/CUGBP1/BRUNOL2, CELF2/CUGBP2/ETR3/BRUNOL3, CELF3/BRUNOL1, CELF4/BRUNOL4, CELF5/BRUNOL5, CELF6/BRUNOL6), forment une famille de protéines de liaison à l'ARN simple brin, présentant de fortes similarités de séquences et de structures

(Barreau et al., 2006 ; Ladd et al., 2001). Parmi elles, deux sont particulièrement impliquées dans la DM1 : CELF1 et CELF2.

Les fonctions de CELF1 sont multiples et dépendantes de sa localisation cellulaire. Dans le noyau, CELF1 agit comme facteur d'épissage (Philips et al., 1998), alors que dans le cytoplasme, il agit comme facteur d'initiation de la traduction (Timchenko et al., 2004) et de stabilisation des ARNm en se fixant à des régions AREs (AU-rich elements) (Timchenko et al., 1999). Bien que CELF1 ne co-localise pas avec les foci d'ARN, elle voit son expression et son activité augmentées chez les patients DM1, due à une stabilisation par hyperphosphorylation, médiée par la voie PKC (Kuyumcu-Martinez et al., 2007 ; Timchenko et al., 1996 ; Wang et al., 2009). Cette dérégulation a des conséquences sur le profil d'épissage de transcrits cibles régulés par CELF1 au cours du développement. La contribution de la surexpression de CELF1 au mécanisme pathologique de la DM1 a été étudiée par la génération de modèles murins surexprimant cette protéine. La surexpression constitutive de CELF1 dans les muscles ou de manière ubiquitaire a résulté en de sévères problèmes de développement, recréant potentiellement les anomalies caractéristiques de la forme congénitale de la DM1 (Ho et al., 2005 ; Timchenko et al., 2004). Pour contourner la forte mortalité observée dans ces deux lignées murines et étudier les conséquences de la surexpression de CELF1 de manière tissu spécifique, un modèle inducible de la surexpression de CELF1 a été créé en utilisant un système basé sur une réponse à la tétracycline. L'induction de l'expression de CELF1 a été réalisée soit dans les muscles squelettiques, soit dans le cœur. Ces souris ont respectivement développé des problèmes musculaires et cardiaques caractéristiques de la DM1 ainsi que des défauts d'épissage de transcrits cibles de CELF1 (Koshelev et al., 2010 ; Ward et al., 2010). Ces données expérimentales suggèrent donc que la surexpression de CELF1 est suffisante pour induire une partie importante du phénotype retrouvé dans la DM1 (myopathie et cardiomyopathie), allant en faveur d'un gain de fonction de CELF1 dans la DM1.

CELF2 a une expression ubiquitaire avec, cependant, une expression plus élevée de l'ARNm dans le cœur, le muscle et le cerveau. Bien qu'il n'existe pas de modèles de souris transgéniques surexprimant CELF2 tels que ceux pour CELF1, de nombreux arguments plaident en faveur de son implication dans la DM1. En effet, CELF2 est surexprimée dans les tissus affectés par la DM1, à savoir, le cœur, les muscles et le cerveau (Dhaenens et al., 2011 ; Hernandez-Hernandez et al., 2013a ; Philips et al., 1998 ; Savkur et al., 2001 ; Timchenko et al., 1996). Dans les modèles murins exprimant les expansions (CUG)<sub>n</sub>, CELF2 voit son expression augmentée tout comme CELF1 (Hernandez-Hernandez et al., 2013a ; Wang et al., 2007). Enfin, CELF2 joue aussi un rôle dans l'épissage alternatif et régule ainsi l'exon 5 de *TNNT2/cTNT*

et d'autres transcrits dérégulés dans la DM1 (Charlet et al., 2002 ; Ladd et al., 2001). Au niveau du cerveau, il a été décrit que CELF2 serait impliquée dans la régulation de l'épissage alternatif des exons 5 et 21 de *GRIN1/NMDAR1*, transcrits connus pour être dérégulés dans la DM1 (Zhang et al., 2002), des exons 2 et 3 de *MAPT/Tau* ainsi que l'exon 10 également dérégulés dans la DM1 (Dhaenens et al., 2011 ; Leroy et al., 2006 ; Sergeant et al., 2001). Une étude plus profonde est néanmoins requise pour déterminer l'implication de cette protéine dans les manifestations neuropsychologiques de la DM1.

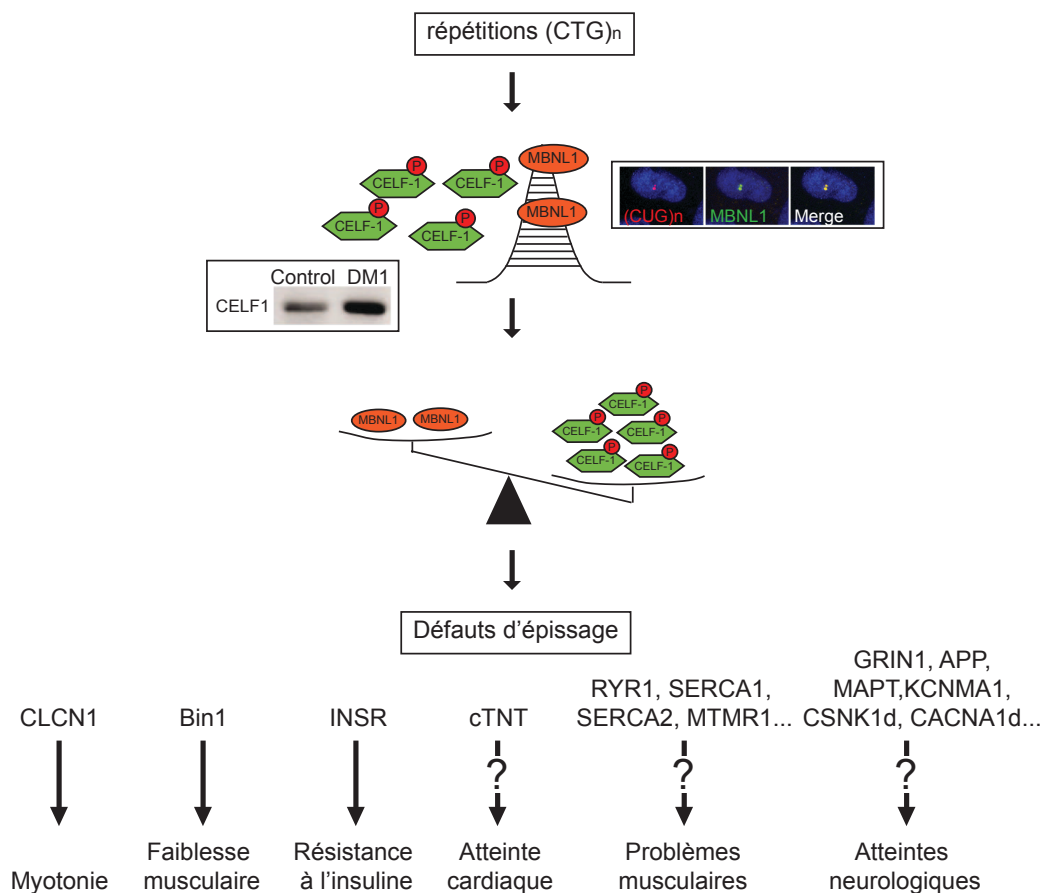
### III.3.3. Rôle pathologique de la splicéopathie

La dérégulation des deux familles de protéines MBNL et CELF a des conséquences sur les profils d'épissage des transcrits cibles (Figure III.2.). Ces deux familles, à effet antagoniste, jouent un rôle essentiel dans la transition de l'épissage entre l'âge fœtal et l'âge adulte (Ladd et al., 2001 ; Lin et al., 2006). Alors que l'expression des protéines CELF diminue entre le stade fœtal et l'âge adulte dans le muscle squelettique, cœur et cerveau (Hernandez-Hernandez et al., 2013a ; Ladd et al., 2001); celle de MBNL augmente dans le SNC (Hernandez-Hernandez et al., 2013b). Dans le cadre de la DM1, cet équilibre protéique est dérégulé et résulte en des anomalies de l'épissage alternatif de transcrits spécialement régulés par MBNL et/ou CELF au cours du développement. Ces transcrits spécifiques ont alors une forte tendance à avoir un profil d'épissage pathologique à l'âge adulte correspondant le plus souvent à un profil d'épissage de type fœtal, et ce particulièrement dans les muscles (Buj-Bello et al., 2002 ; Charlet et al., 2002 ; Jiang et al., 2004 ; Philips et al., 1998 ; Savkur et al., 2001 ; Sergeant et al., 2001). De plus, la dérégulation de certains exons alternatifs peut être tissu spécifique ou même spécifique de certaines régions particulières dans le cerveau, mais pas dans d'autres territoires voisins (Hernandez-Hernandez et al., 2013b)

L'implication des défauts d'épissage dans le développement des symptômes de la DM1 a été démontrée grâce aux modèles murins. Un des transcrits dérégulés et à l'origine d'un des symptômes de la DM1 est celui du canal chlore *CLCN1*, spécifique du muscle. L'altération de son profil d'épissage alternatif résulte en une protéine tronquée et non fonctionnelle. Or, l'absence de cette protéine est associée à des troubles de conduction chlorure menant à la myotonie. La correction de ce défaut par l'injection des oligonucleotides antisens a permis de restaurer la myotonie dans un modèle murin DM1 (Charlet et al., 2002 ; Mankodi et al., 2002 ; Wheeler et al., 2007), ce qui démontre clairement l'effet pathologique de l'épissage anormale de



*CLCN1* sur l'apparition de la myotonie dans la DM1. Récemment, le défaut d'épissage de *bridging integrator 1 (BIN1)* a été associé à la faiblesse musculaire observée chez les patients (Fugier et al., 2011). En effet, BIN1 est impliquée dans la biogenèse des tubules T musculaires spécifiques de la structure membranaire des muscles squelettiques et essentiel au phénomène d'excitation/contraction musculaire. Le défaut d'épissage observé chez les patients DM1 résulte en une forme inactive de BIN1 et donc en une altération des tubules T musculaires. Une reproduction de l'altération de l'épissage alternatif de *Bin1* dans des souris non-transgéniques (en absence des répétitions CUG toxiques) est suffisante pour induire l'altération des tubules T et une faiblesse musculaire, caractéristique de la DM1 (Fugier et al., 2011). Egalement, une baisse de l'inclusion de l'exon 11 de *INSR* a également été rapportée dans la DM1. Il en résulte une protéine moins fonctionnelle dans la signalisation de la voie insuline qui pourrait expliquer l'insulino-résistance observée chez les patients (Savkur et al., 2004). Enfin, le transcrit *TNNT2/cTNT*, anormalement épissé dans la DM1, va coder une protéine dont les propriétés contractiles sont affectées. Cette dysfonction peut être corrélée aux symptômes cliniques observés chez les patients DM1, notamment à l'atteinte cardiaque (Philips et al., 1998). Cependant, aucune démonstration directe n'existe à ce jour pour le rôle pathologique de l'épissage anormal de *TNNT2/cTNT*.



**Figure III.2. Mécanismes de la splicéopathie de la DM1, dû au gain de fonction toxique des ARNs amplifiés.** En situation normale, il existe un équilibre entre deux facteurs antagonistes de l'épissage: MBNL1 et CELF1. L'équilibre entre ces deux facteurs joue un rôle central dans la transition vers un profil d'épissage adulte pour une série de gènes régulés au cours du développement. Les expansions (CUG)<sub>n</sub> observées dans la DM1 forme une structure double brin ayant au moins deux conséquences pathologiques sur ces deux familles : la séquestration de MBNL1 au sein des foci nucléaires, et une surexpression de CELF1 associée à une hyperphosphorylation, par la voie PKC, de cette protéine, induisant sa stabilisation. Cela résulte en une dérégulation de l'équilibre MBNL1/CELF1 modifiant ainsi le profil d'épissage d'une série de gènes régulés au cours du développement en un profil foetal. L'expression anormale de ce profil d'épissage dans les muscles squelettiques adultes a été impliquée dans le développement de symptômes caractéristiques de la maladie. D'autres homologues de ces deux familles (notamment MBNL2 et CELF2) peuvent aussi jouer un rôle dans le mécanisme pathologique de la DM1.

La plupart des études sur la pathogenèse moléculaire de la DM1 se sont focalisées sur le tissu musculaire et cardiaque, où une quinzaine de transcrits sont mal épissés. Dans le cerveau des patients DM1, *MAPT/Tau*, *GRIN1/NMDAR1*, *MBNL1* et *APP* ont été décrits comme étant mal épissés (Hernandez-Hernandez et al., 2013b ; Hernandez-Hernandez et al., 2013a ; Jiang et al., 2004 ; Sergeant et al., 2001). Plus récemment, de nouveaux défauts d'épissage ont été détectés au niveau du cerveau des patients DM1 (Charizanis et al., 2012 ; Hernandez-Hernandez et al., 2013a ; Suenaga et al., 2012). Mais le lien direct avec un des phénotypes neuropsychologiques reste à être établi.

### III.4. DM1, pathologie modèle de la toxicité de l'ARN

Le mécanisme pathologique de la DM1 est médié par le transcrit *DMPK* contenant les expansions  $(CUG)_n$ . L'expression de ces messagers toxiques perturbe la fonction de certaines protéines de liaison à l'ARN, ce qui dérégule le métabolisme d'autres ARNs en aval. Ce mécanisme de gain de fonction toxique ARN a aussi été décrit dans d'autres pathologies à triplets répétés et fait l'objet de deux revues en annexe de ce chapitre (Sicot et al., 2011 ; Sicot and Gomes-Pereira, 2013). Cette section abordera les points principaux partagés par un nombre de maladies, dites maladies avec une toxicité des ARNs.

#### III.4.1. Syndrome de l'X fragile avec tremblements et ataxie (FXTAS)

Le syndrome de l'X fragile est la forme la plus commune de retard mental héréditaire et est associée à l'expansion anormale du triplet CGG dans la partie 5'UTR du gène *Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1)*. Alors que les individus sains ont moins de 55 répétitions, les patients X fragile portent plus de 200 répétitions CGG (Oberle et al., 1991 ; Richards et al., 1991 ; Verkerk et al., 1991). Les personnes âgées porteuses de la prémutation, variant de 55 à 200 CGG, développent une pathologie neurodégénérative appelée syndrome du X fragile avec tremblements et ataxie (FXTAS), principalement caractérisée par une ataxie cérébelleuse et des tremblements, parmi d'autres atteintes neurologiques (Brouwer et al., 2008). Un gain de fonction toxique des répétitions d'ARN CGG a été suggéré pour expliquer le mécanisme pathologique de FXTAS. La présence d'inclusions nucléaires ubiquitine-positives a été détectée dans les cellules neuronales et astrocytaires de patients *post mortem* (Arocena et al., 2005 ; Greco et al., 2002 ; Tassone et al., 2004). Ces inclusions contiennent l'ARNm *FRM1* et perturbent des interactions protéines/ARN, à l'image de la séquestration de deux protéines capables de fixer le motif CGG de la prémutation : hnRNP A2/B1 et la protéine PURA (Purine-rich element binding A) (Jin et al., 2007 ; Sofola et al., 2007). Ces protéines séquestrées ne peuvent donc pas assumer correctement leurs fonctions. D'autres intermédiaires pathologiques ont été identifiés grâce à leur capacité pour supprimer le phénotype oculaire neurodégénératif de drosophile, dû à l'expression du transcrit contenant les expansions  $(CGG)_n$ , tels que CELF1, Hsp70 et plusieurs histones deacetylases (HDACs) (Jin et al., 2003). Plus récemment, une équipe a mis en évidence la co-localisation au sein des inclusions ARNm nucléaires FXTAS, de Sam68 et de MBNL1, deux régulateurs de l'épissage (Iwahashi et al., 2006 ; Sellier et al., 2010), ainsi que de la protéine de liaison à l'ARN double brin DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8). La liaison de DGCR8 aux répétitions CGG résulte en sa partielle

séquestration ainsi que celle de son partenaire DROSHA (Drosha, Ribonuclease Type III). En conséquence du rôle de DGCR8 et DROSHA dans la maturation des micro ARNs (miARNs ou miRs), l'inactivation de ces deux protéines par les foci CGG résulte en une baisse du niveau de miARNs matures dans les cellules neuronales exprimant les expansions CGG ainsi que dans le cerveau des patients FXTAS (Sellier et al., 2013). L'ensemble de ces observations suggère une toxicité cellulaire due aux ARNm prémutés. Cependant, le rôle de ces protéines séquestrées reste à être élucidé chez l'homme, ainsi que le mécanisme pathologique précis en cause dans FXTAS.

#### III.4.2. Ataxie spinocérébelleuse (SCAs) de type 8 (SCA8) et la traduction RAN.

Les patients atteints de SCA8 présentent une ataxie du cervelet et une neurodégénérescence progressive (Day et al., 2000 ; Koob et al., 1999). SCA8 est causée par l'expansion des répétitions CTG•CAG transcrites dans les deux sens. Il en résulte la production d'un transcrit CAG *ATXN8OS* et un transcrit CUG *ATXN8* (Ikeda et al., 2008). Comme pour la DM1, le transcrit contenant les expansions CUG s'accumule sous forme de foci nucléaires et séquestre les protéines MBNL, résultant en une dérégulation de l'épissage alternatif notamment dans le cervelet (Daughters et al., 2009). De plus, des cibles potentielles de CELF1 sont anormalement exprimées, mais il reste à démontrer que CELF1 lui-même est dérégulé dans SCA8. En parallèle, la traduction de l'ARN CAG *ATXN8OS* produit des polyglutamines qui s'accumulent sous forme d'inclusions nucléaires (Moseley et al., 2006).

Un modèle murin transgénique exprimant la construction du transgène SCA8 (CTG•CAG)<sub>118</sub> dans les deux directions recrée certaines caractéristiques de la maladie, comme une neurodégénérescence progressive au niveau du cervelet associée à l'accumulation des foci d'ARN contenant des répétitions CUG ainsi que la présence d'agrégats de polyglutamines (Moseley et al., 2006). Ce modèle murin apporte un élément déterminant quand à l'implication de deux types de toxicité, ARN et protéique, dans le mécanisme pathologique de SCA8.

La toxicité protéique ne s'arrête pas à l'accumulation de polyglutamines et peut résulter d'un mécanisme de traduction moins familier, mis en évidence tout d'abord dans un modèle cellulaire exprimant le transcrit *ATXN8OS* contenant les expansions CAG et ôté de son codon d'initiation ATG. De manière surprenante, une traduction sous les trois cadres de lecture possibles a été observée générant ainsi des polyglutamines, des polysérines et des polyalanines par un phénomène non conventionnel appelé traduction associée aux répétitions et non-médiée par ATG [repeat-associated non-ATG-mediated (RAN)] (Zu et al., 2011). L'accumulation des protéines traduites par RAN a été confirmée dans le cerveau des patients et des

souris transgéniques SCA8. Cette traduction RAN n'est pas exclusive de la SCA8 ; elle a aussi été détectée dans d'autres pathologies comme la DM1 (Zu et al., 2011), FXTAS (Todd et al., 2013) et la sclérose latérale amyotrophique (ALS) (Ash et al., 2013). L'implication et les conséquences de l'accumulation des « peptides RAN » restent encore inconnues dans le mécanisme pathologique de ces maladies.

#### III.4.3. La maladie de Huntington type 2 (HDL2)

HDL2 est une maladie neurodégénérative, cliniquement similaire à la chorée de Huntington (HD), et caractérisée par une chorée, une dystonie (mouvements anormaux involontaires suite à des contractions musculaires prolongées et des spasmes), une atteinte cognitive et une démence. Cette pathologie est due à l'expansion anormale de CTG•CAG dans le gène de la *junctophilin-3 (JPH3)*, traduit dans les deux sens. Il en résulte la génération de transcrits contenant les expansions soit CAG soit CUG (Holmes et al., 2001). En fonction de l'épissage alternatif, les expansions CUG contenues par le transcrit sens *JPH3* peuvent coder soit pour des polyalanines, soit pour des polyleucines, soit être situées dans la partie 3'UTR du transcrit (Holmes et al., 2001). Comme dans la DM1, des foci nucléaires d'ARN ont été détectés dans les neurones des patients HDL2, associés à la co-localisation de MBNL1 (Rudnicki et al., 2007), suggérant un mécanisme gain de fonction de l'ARN. En parallèle, des agrégats de polyglutamines s'accumulent de manière indépendante des foci d'ARN dans un modèle murin de HDL2, et co-localisent avec l'ubiquitine. Ces données suggèrent aussi un rôle pathologique du transcrit antisens contenant les expansions CAG émanant du locus HDL2 (Seixas et al., 2012 ; Wilburn et al., 2011). Ainsi, cette maladie présente un mécanisme pathologique combinant à la fois une splicéopathie médiée par la séquestration de MBNL1 par les foci d'ARN, et une toxicité due aux polyglutamines.

#### III.4.3. Autres ataxies spinocérébelleuses: SCA10 et SCA12

La séquestration de MBNL au sein d'inclusions ribonucléaires est commune à plusieurs mécanismes moléculaires comme celui de la DM1, FXTAS, SCA8 et HDL2. Cependant, d'autres maladies à toxicité de l'ARN, qui présentent aussi l'accumulation de foci d'ARN et des défauts d'épissage, impliquent la séquestration nucléaire anormale de différentes protéines de liaison à l'ARN.

**SCA10** | SCA10 est une maladie neurodégénérative dont le tableau clinique est très variable et peut aller de la pure ataxie cérébelleuse à une pathologie plus

complexe impliquant de l'épilepsie ou des troubles neuropsychologiques (Rasmussen et al., 2001). Elle est due à l'expansion anormale du pentanucléotide ATTCT non codant au sein du gène *Ataxin 10* (*ATXN10*), dont la fonction est encore méconnue (Matsuura et al., 2000). Cette expansion est normalement transcrite, épissée et traduite, et les souris déficientes pour *l'ataxin 10* ont un phénotype normal, ce qui signifie que l'haploinsuffisance de ce gène ne joue pas un rôle majeur dans le mécanisme pathologique (Teive et al., 2011). En effet, la localisation intronique des répétitions et l'accumulation du transcrit *ATXN10* contenant les répétitions AUUCU au sein du noyau et du cytoplasme de fibroblastes de patients (White et al., 2010) indiquent plutôt un gain de fonction toxique par les transcrits amplifiés. Cela a été confirmé par la génération de modèles murins transgéniques exprimant les expansions AUUCU soit dans l'intron du gène de la globine  $\beta$  de lapin (White et al., 2010), soit dans la partie 3'UTR du gène *LacZ* (White et al., 2012). Ces deux modèles présentent l'accumulation des foci d'ARN cytoplasmiques et nucléaires (White et al., 2012 ; White et al., 2010), associée à un phénotype ataxique et épileptique, ressemblant aux symptômes des patients, pour l'un des deux modèles murins (White et al., 2012). De plus, la protéine de liaison à l'ARN hnRNP K a été retrouvée séquestrée au sein des foci d'ARN dans les fibroblastes de patients et dans le cerveau de souris transgéniques SCA10 (White et al., 2012 ; White et al., 2010), indiquant la présence d'interactions protéines/ARN anormales due à l'expression des expansions AUUCU. Cela a pour conséquence une baisse de l'activité de hnRNP K, associée à une dérégulation de l'épissage des transcrits régulés par hnRNP K (White et al., 2010). Les expansions AUUCU amplifiées dans SCA10 provoquent des événements toxiques, indépendamment de leur localisation génomique, suggérant un gain de fonction toxique ARN. Cependant, des questions importantes requièrent de plus amples investigations, comme la contribution précise de la perte de fonction hnRNP K dans le mécanisme pathologique.

**SCA12** | SCA12 présente un tableau clinique assez hétérogène incluant une ataxie typique, des tremblements des membres supérieurs et de la tête, une démence et des troubles psychiatriques (Holmes et al., 2003). Elle est due à l'amplification anormale du triplet CAG au sein de la partie 5'UTR du gène *Protein Phosphatase 2, Regulatory Subunit B, beta* (*PPP2R2B*), qui possède plusieurs sites alternatifs pour l'initiation de la transcription et des sites d'épissage alternatif. Il en résulte différents variants. Ainsi, les expansions CAG peuvent être localisées juste avant le site de transcription du transcrit *B $\beta$ 1* (Holmes et al., 2003) provoquant une augmentation de son niveau d'expression, dont les conséquences sont encore méconnues (Lin et al., 2010). Les expansions CAG peuvent aussi être localisées au sein du premier intron

du variant alternatif  $B\beta 2$  (Holmes et al., 2003). Les conséquences physiologiques de cette mutation sont aussi très peu connues. Néanmoins, la surexpression du transcrit  $B\beta 2$  contenant les expansions CAG dans la drosophile provoque une dysfonction mitochondriale, un stress oxydatif et une mort neuronale (Wang et al., 2011). Comme il n'est pas connu si le niveau du transcrit  $B\beta 2$  est modifié chez les patients SCA12, l'implication de ces découvertes dans la pathologie humaine reste à être étudiée. Cependant, l'effet toxique des amplifications anormales introniques CAG de l'isoforme  $B\beta 2$  est compatible avec un gain de fonction de l'ARN. Il reste à démontrer si ce transcrit s'accumule au sein des cellules SCA12 et perturbe les protéines de liaison à l'ARN via des interactions anormales. La génération de modèles animaux de SCA12, porteurs des expansions CAG dans son contexte génomique naturel, serait essentielle pour comprendre les bases du mécanisme moléculaire de cette pathologie.

L'ensemble de ces pathologies à expansions de triplets partage certaines caractéristiques : l'accumulation toxique des ARNs mutés associées au développement d'interactions ARN/protéine anormales, pouvant résulter en une perte de fonction de la protéine séquestrée donnant lieu à un métabolisme anormal des ARNs en aval, à l'image de la perturbation de l'épissage alternatif de transcrits cibles.

### III.5. Autres évènements pathologiques dans la DM1

Au delà de la splicéopathie caractéristique de la DM1, et responsable de certains symptômes importants dans la maladie, d'autres mécanismes sont aussi impliqués dans la pathogenèse moléculaire.

#### III.5.1. Altération de l'expression génique

L'effet des expansions CTG toxiques dans la DM1 sur l'expression des gènes a tout d'abord été démontré par une analyse microarray faite à partir de biopsies de muscles de patients DM1 et DM2 (Botta et al., 2007). Cette analyse a révélé la dérégulation de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme du calcium, du potassium et dans les fonctions mitochondriales. L'étude comparée du niveau d'expression de gènes par microarrays dans les muscles squelettiques du modèle murin  $HSA^{LR}$  de la DM1 a révélé que 60 à 70% des changements induits par l'expression des répétitions CUG étaient retrouvés dans des souris invalidées pour

*Mbnl1*. Cela suggère que cette dérégulation transcriptionnelle résulte en partie de la perte de fonction de MBNL1 (Osborne et al., 2009), qui joue donc aussi un rôle dans la régulation transcriptionnelle de certains gènes cibles. En effet, MBNL1 est capable de lier directement dans la partie 3'UTR de transcrits cibles et de réguler la stabilité de certains ARNm (Masuda et al., 2012).

Une alternative pour expliquer l'expression altérée de certains gènes est la conséquence directe des expansions anormales sur certains facteurs de transcription. En effet, la conformation double-brin et la rétention nucléaire de l'ARN muté favorisent la fixation de protéines nucléaires possédant un domaine de liaison au motif CUG. Ainsi, les transcrits *DMPK* mutés retiennent des facteurs tels que SP1, STAT3, STAT4 et RAR $\gamma$  (Ebraliidze et al., 2004). La perte de fonction de certains facteurs due à leur déplétion du nucléoplasme et/ou cytoplasme entraînent des dérégulations de la transcription et de l'épissage alternatif. Il est important de préciser que même si ces protéines ne sont pas séquestrées dans les foci d'ARN, elles voient leurs expressions dérégulées. L'absence de co-localisation de ces facteurs de transcription n'exclut pas leur implication dans le mécanisme pathogénique. En effet, il est concevable qu'une fraction d'ARN *DMPK* mutés ne s'agrège pas sous formes d'inclusions et reste soluble dans les cellules, interagissant ainsi avec les facteurs de transcription et régulateurs de l'épissage (Junghans, 2009).

L'augmentation de l'expression du facteur NKX2-5 dans les muscles squelettiques et cardiaques de patients DM1 affecte également l'expression de cibles en aval, contribuant très probablement aux anomalies de conduction cardiaque et aux défauts de régénérescence musculaire observés chez les patients DM1 (Yadava et al., 2008). Enfin, plus récemment, une étude comparative du profil d'expression génique dans des cellules neuronales DM1 et dans le cerveau de patients DM1 par rapport à des contrôles a permis de mettre en évidence l'expression diminuée de deux membres de la famille SLITRK (SLIT And NTRK-Like). La dérégulation de l'expression de SLITRK4, impliquée dans la croissance neuronale et la synaptogenèse, pourrait contribuer aux défauts de formation des neurites et des synapses au niveau des jonctions neuromusculaires dans la DM1 (Marteyn et al., 2011).

### III.5.2. Dérégulation du métabolisme des miARNs

La dérégulation d'un certain nombre de miARNs a été décrite dans le cœur et les muscles squelettiques (Gambardella et al., 2010; Perbellini et al., 2011 ; Rau et al., 2011). L'expression de miR-1 est diminuée dans le cœur de patients DM1 et DM2 et est liée à la perte de fonction de MBNL1, affectant la maturation du pre-miR-1 (Rau et al., 2011). Cette dérégulation des miARNs dans la DM1 altère l'expression de



transcrits cibles, contribuant potentiellement à la pathogenèse de la maladie (Perbellini et al., 2011 ; Rau et al., 2011).

### III.5.3. Altération de la traduction

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

Plus récemment, il a été montré que la surexpression de SMAUG1, impliquée dans la régulation de la traduction, supprime le phénotype de la faiblesse musculaire et restaure une fonction musculaire normale dans un modèle DM1 de drosophile. Dans les myoblastes de patients DM1, il a été démontré que l'homologue humain SMAUG1/SAMD4A est capable de restaurer les fonctions traductrices de CELF1. Ces résultats mettent en évidence le rôle des anomalies de la traduction dans la pathogenèse de la DM1 (de Haro et al., 2013).

### III.5.4. La transcription bidirectionnelle

La transcription bidirectionnelle consiste en la synthèse d'un ARN à partir du brin d'ADN sens, ainsi que du brin complémentaire dit aussi antisens. Il en résulte deux types de transcrits : un transcrit sens et un transcrit antisens. Les transcrits antisens peuvent être traduits en protéine ou être des transcrits non codants (Faghihi and Wahlestedt, 2009). Dans le génome des mammifères, le plus souvent, le transcrit ARN antisens est non codant et partenaire du transcrit sens, codant pour une protéine. Les transcrits antisens peuvent être impliqués dans divers mécanismes de régulation transcriptionnelle et traductionnelle intervenant alors dans plusieurs voies biologiques, comme la régulation de la transcription, des interactions ADN/ARN et ARN/ARN (Katayama et al., 2005). La part du génome transcrite dans les deux sens est estimée à plus de 70%, suggérant un rôle non négligeable des ces transcrits antisens.

Dans le cadre de la DM1, il a été récemment décrit l'existence d'un brin antisens au locus DM1, émanant de la région régulatrice adjacente *SIX5* et se prolongeant dans la région insulatrice de la partie 3'UTR de *DMPK*, située entre *DMPK* et *SIX5* (Cho et al., 2005). Il a été proposé que la maturation de l'antisens *DMPK* en fragments de 21 nucléotides puisse être impliquée dans la régulation de la

structure chromatinienne environnante. Dans le locus DM1, il existe deux sites de liaison CTCF (*CCCTC-binding factor*) de part et d'autre des répétitions CTG. Ils jouent un rôle isolateur entre *DMPK* et *SIX5*. En effet, la liaison du facteur CTCF aux sites de liaison CTCF affecte l'état de chromatinisation et de transcription du locus DM1, limitant alors la transcription de l'antisens. En revanche, les répétitions CTG amplifiées dans la DM1 sont associées à une perte de fonction des sites de liaison CTCF. Ces derniers sont toujours présents mais la protéine CTCF ne s'y lie plus. L'effet isolateur n'est plus maintenu et la transcription de *DMPK* est alors influencée par l'enhancer de *SIX5*. En conséquence, l'expression de *DMPK* ainsi que de l'antisens est augmentée en présence des expansions CTG, et ce dès l'embryogenèse. Cette expression augmentée de *DMPK* pendant l'embryogenèse, conséquence du rôle activateur de l'enhancer de *SIX5*, peut alors contribuer à l'apparition plus précoce de la maladie pour les cas congénitaux de DM1 (Cho et al., 2005).

La formation des structures doubles brins provenant soit de la structure en épingle à cheveux du transcrit avec les expansions  $(CUG)_n$ , soit d'une hybridation complémentaire des transcrits *DMPK* sens et antisens, peut aussi activer la voie des ARN interférants (ARNi) (Krol et al., 2007 ; Yu et al., 2011b).

### III.5.6. La traduction RAN

Enfin, un autre mécanisme potentiellement pathologique a été récemment décrit et consiste en la traduction RAN, initialement décrit dans SCA8 (Zu et al., 2011) (voir III.4.2). Il s'avère que le transcrit *DMPK* porteur des expansions nucléotidiques peut être traduit en l'absence d'un site initiateur ATG, à partir de plusieurs cadres de lecture. La traduction des codons CUG, UGC et GCU pourrait donc générer respectivement les polypeptides polyleucines, polycystéines et polyalanines. A l'image du transcrit sens, le transcrit antisens pourrait être soumis à la traduction RAN de ces trois cadres de lectures : les codons CAG, AGC et GCA pourraient générer des homopolymères de glutamine, de serine et d'alanine. En effet, l'accumulation des agrégats de polyglutamines a été confirmé, dans un modèle murin de la DM1 et dans des myoblastes de patients DM1 (Zu et al., 2011). Cependant, la contribution de la protéotoxicité potentielle de ces homopolymères dans le mécanisme pathologique de la DM1 reste encore floue.

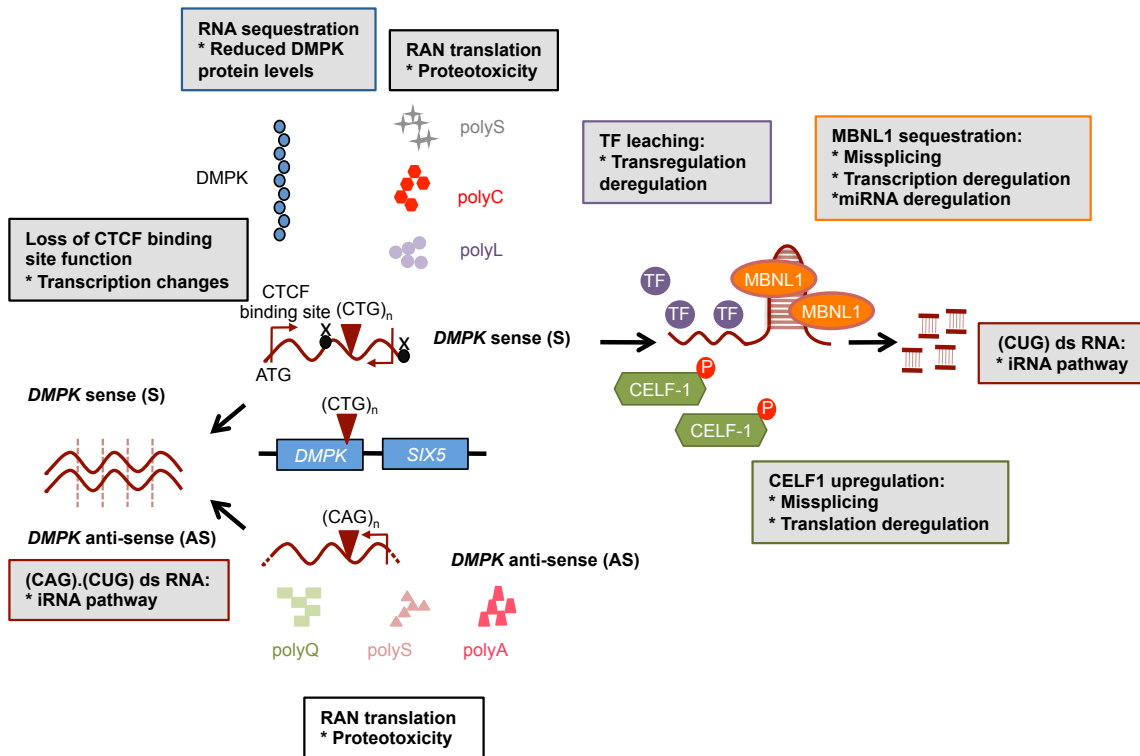
### III.5.7. Dérégulation de l'activité kinase

Dans la DM1, CELF1 voit son expression et son activité augmentées chez les patients DM1, due à une stabilisation par hyperphosphorylation médiée par la voie

PKC (Kuyumcu-Martinez et al., 2007 ; Timchenko et al., 1996 ; Wang et al., 2009). CELF1 n'est pas le seul candidat sujet à une hyperphosphorylation et d'autres kinases semblent être dérégulées dans la DM1. En effet, l'expression des expansions CTG dans des cellules PC12 provoque une dérégulation de la voie Akt/GSK3 $\beta$ , voie impliquée dans la phosphorylation entre autres de la protéine Tau, qui se trouve hyperphosphorylée. L'ensemble de ces dérégulations peut alors contribuer aux défauts de différenciation neuronale des cellules PC12 qui expriment des répétitions CTG amplifiées (Hernandez-Hernandez et al., 2006). GSK3 $\beta$  est aussi activée dans d'autres modèles de la maladie. Dans les souris *HSA*<sup>LR</sup>, une activation accrue de GSK3 $\beta$  a été observée dans les muscles, pouvant contribuer à la faiblesse musculaire (Jones et al., 2012). Une activation de GSK3 $\beta$  a aussi été observée dans un modèle de cellules neuronales DM1, ce qui entraîne une dérégulation de la voie de signalisation de mTOR [Mechanistic Target of Rapamycin (Serine/Threonine Kinase)], et subséquente réduction de la capacité proliférative (Denis et al., 2013).

Enfin, les larges expansions CTG sont aussi capables d'activer d'autres protéines kinases, à l'image de PKR (Protéine Kinase R) qui s'autophosphoryle après liaison à l'ARN double brin porteur d'un motif CUG. Cette activation active à son tour d'autres voies impliquées notamment dans le stress cellulaire ou active le facteur d'initiation de la traduction EIF2A (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 2A*). Ainsi, l'expression de grandes expansions CTG a pour conséquence une activation anormale de PKR *in vitro*, et donc une phosphorylation de ces cibles en aval (Tian et al., 2000).

A la vue de l'ensemble de ces résultats, il semblerait donc que les voies cellulaires de phosphorylation soient perturbées suite à l'expression des expansions CTG. Cependant, une analyse plus détaillée sur des modèles animaux et dans le cerveau des patients DM1 est nécessaire, notamment pour comprendre les conséquences fonctionnelles de cette dérégulation.



**Figure III.3. Complexité du mécanisme moléculaire de la pathogénèse de la DM1 :** toxicité ARN, splicéopathie, dérégulation de l'expression de gènes et protéotoxicité. Le gène *DMPK* contenant les expansions (CTG)<sub>n</sub> est transcrit en ARN sens et antisens. Le transcrit *DMPK* muté forme une structure alternative et s'accumule dans le noyau de cellules DM1 formant des foci, provoquant la diminution de l'expression de la protéine DMPK. La perte de fonction de MBNL1 (et d'autres membres de la même famille), à cause de sa séquestration au sein des foci d'ARN, dérégule non seulement l'épissage alternatif mais aussi le métabolisme de la transcription et des microARNs. L'hyperphosphorylation et l'augmentation de l'expression de CELF1 affectent l'épissage alternatif et la transcription. La retenue des facteurs de transcription par le transcrit *DMPK* muté peut aussi changer l'expression de gènes cibles. La voie des ARNs interférants peut aussi être activée par les structures ARN double brin, qui proviennent soit de la structure en épingle à cheveux du transcrit avec les expansions (CUG)<sub>n</sub>, soit d'une hybridation complémentaire des transcrits *DMPK* sens et antisens. Les deux derniers peuvent aussi être traduits en l'absence de codon d'initiation ATG et générer ainsi des polypeptides, potentiellement toxiques pour la cellule. Adapté de (Sicot et al., 2011).

#### IV. STRATEGIES THERAPEUTIQUES

La meilleure compréhension du mécanisme moléculaire de la DM1 a établi une base pour développer des stratégies thérapeutiques, visant différents événements de la maladie, en cause dans d'importantes caractéristiques de la pathologie. Ainsi ces stratégies vont agir directement sur les triplets répétés CTG, sur les ARNs toxiques, sur l'expression des protéines CELF ou MBNL ou sur les transcrits cibles. Les modèles animaux ont largement contribué à la validation des approches pour neutraliser les effets délétères des expansions CTG dans la DM1. Certaines de ces stratégies seront développées dans ce paragraphe, et résumées dans le Tableau IV.1., adapté d'une revue présente en annexe de ce chapitre (Sicot and Gomes-Pereira, 2013).

#### IV.1. Nature réversible du phénotype DM1

L'utilisation de modèles animaux a permis d'observer le caractère réversible du phénotype DM1, ouvrant ainsi la route aux stratégies thérapeutiques. En effet, un modèle conditionnel surexprimant le transcrite *DMPK* avec une courte répétition du motifs CTG, dans le cœur ou dans les muscles, a présenté un phénotype proche de celui des patients DM1, incluant un défaut de conduction cardiaque, une myotonie, des anomalies de l'épissage alternatif ainsi que des changements histopathologiques et une surexpression de *CELF1*. En éteignant l'expression du transgène conditionnellement exprimé au sein d'un tissu spécifique, et donc en éteignant la production toxique des ARNs dans ce modèle conditionnel, le phénotype observé précédemment a été supprimé (Mahadevan et al., 2006). Par conséquent, le tissu musculaire n'est pas irréversiblement altéré par la maladie. Ces résultats ont amené la preuve que les symptômes associés à la DM1 sont réversibles, au moins dans le muscle squelettique et cardiaque, ouvrant ainsi la porte au développement de stratégies thérapeutiques.

#### IV.2. Dégradation du transcrite toxique porteur des expansions

Le développement de la technologie des antisens nous permet directement de cibler le transcrite ARN toxique. Ainsi, pour être efficace, ces oligonucléotides antisens (OAS) doivent atteindre et hybrider de manière spécifique la cible ARN afin d'activer sa dégradation. Cela requiert un minimum de temps de demi-vie au sein des tissus pour la molécule et une biodistribution appropriée (Southwell et al., 2012). Un retrovirus exprimant un OAS complémentaire des expansions a été testé sur des myoblastes de patients DM1, et son expression résulte en une baisse de l'expression du transcrite muté *DMPK*, une restauration de la différenciation myoblastique ainsi qu'une correction du niveau d'expression de *CELF1* dans les cellules DM1 infectées (Furling et al., 2003).

L'utilisation de ces OAS s'est aussi avérée efficace pour l'élimination du transcrite *DMPK* contenant les expansions CTG. En effet, l'OAS modifié avec un 2'-O-méthyl phosphorothioate (2OMe OAS) a été dessiné pour cibler directement les expansions CUG. L'administration locale dans le muscle squelettique du modèle murin DM1 *HSA<sup>LR</sup>* a résulté en la réduction de 30 à 70% du transcrite toxique. En conséquence, le nombre de foci d'ARN a été réduit de manière significative, la distribution de *MBNL1* est devenue plus diffuse et les défauts d'épissage ont été corrigés. Cependant, la correction de la myotonie n'a pas été observée (Mulders et al., 2009). Plus récemment, l'injection subcutanée d'un OAS modifié dans le modèle

murin *HSA<sup>LR</sup>* a résulté en une sévère baisse du niveau de transcrit toxique, associée à une réduction du nombre de foci, une correction des défauts d'épissage et de la myotonie. Ces effets ont été détectés deux semaines suivant l'injection des OAS et ont persisté pendant un an, démontrant la dégradation sélective du transcrit cible, la stabilité et une activité à long terme de la molécule thérapeutique (Wheeler et al., 2012).

Egalement, afin de développer une stratégie à long terme, sans injection répétée d'OAS, le gène *RNU7-1* (*RNA U7 small nuclear 1*) a été modifié de manière à exprimer l'antisens (CAG)<sub>n</sub> pour cibler les expansions CUG du transcrit *DMPK* mutant. Dans des cellules musculaires de patients DM1 transduites avec cette construction, l'expression de *DMPK* porteur des expansions CTG ainsi que le nombre de foci ont été réduits. Cela a également permis de libérer MBNL1 des foci et de restaurer un épissage normal pour les transcrits *DMD*, *BIN1* and *LDB3*, anormalement épissés dans les cellules musculaires de patients DM1 (Francois et al., 2011).

### IV.3. Compensation de la perte de fonction de MBNL

La réversion phénotypique peut aussi être déclenchée via la modulation du niveau et/ou de l'activité des facteurs d'épissage altérés dans la pathologie. Parmi eux, les facteurs de la famille MBNL, et particulièrement MBNL1, sont connus pour être impliqués dans la dérégulation de l'épissage de transcrits cibles dans les muscles squelettiques, dans la dérégulation de la transcription et du métabolisme des miARNs. Restaurer la fonction de cette famille de protéines a donc été une stratégie thérapeutique développée par plusieurs équipes (Tableau IV.1.).

#### IV.3.1. Surexpression de MBNL

La surexpression de MBNL1 dans un modèle de drosophile (de Haro et al., 2006) et de souris (Kanadia et al., 2006), exprimant un niveau toxique de transcrits contenant les expansions CUG, a corrigé les phénotypes caractéristiques de la DM1. La surexpression de MBNL1 dans le modèle murin *HSA<sup>LR</sup>* par injection virale au niveau des muscles squelettiques a permis la restauration des défauts d'épissage et la correction de la myotonie (Kanadia et al., 2006). Egalement, le croisement de la lignée *HSA<sup>LR</sup>*, présentant des symptômes musculaires caractéristiques de la DM1, avec une lignée surexprimant MBNL1, a résulté en une diminution des défauts d'épissage ainsi que la correction de la myotonie et de la myopathie (Chamberlain and Ranum,

2012). Ces résultats montrent que la restauration de l'expression de MBNL1 permet de rétablir un phénotype musculaire normal.

#### **IV.3.2. Inhibition de l'interaction avec les transcrits ARNs toxiques**

Une autre approche pour réduire l'effet toxique des expansions CUG est de bloquer l'accès aux expansions du transcrit toxique, afin d'empêcher les interactions ARN/protéines anormales observées dans la DM1. Des OAS (CAG)<sub>25</sub> modifiés ont été produits pour lier les répétitions avec une grande affinité. Une injection locale dans le modèle DM1 *HSA*<sup>LR</sup> au niveau du muscle squelettique a inhibé la liaison de MBNL1 aux ARNs contenant les expansions et permis une redistribution de MBNL1 et une correction partielle des défauts d'épissage, suffisante pour corriger la myotonie (Wheeler et al., 2009).

Dans le cadre de la recherche de composés moins chers à produire, un screening de molécules chimiques a identifié la pentamidine comme ayant une forte affinité avec les répétitions CUG, et capable donc d'inhiber la liaison et la séquestration de MBNL1 par les ARNs toxiques. Bien que son administration a permis de restaurer les défauts d'épissage des muscles squelettiques des souris *HSA*<sup>LR</sup>, cette molécule reste très toxique et donc son utilisation thérapeutique limitée (Warf et al., 2009). Cependant, cela a permis de valider la stratégie d'inhiber l'interaction avec les transcrits ARNs et ouvert d'autres voies de thérapies pharmacologiques (Kumar and Vadlamudi, 2002 ; Ofori et al., 2012 ; Parkesh et al., 2012).

Stratégies thérapeutiques	Stratégie, type d'administration	Modèle murin	Effet sur les foci d'ARN	Effet sur l'épissage alternatif	Effet sur le phénotype	Références
Extinction de l'expression	Construction inductible du transgène	Surexpression de (CTG) <sub>5</sub>	N/A	Réversion des défauts d'épissage	Correction de la myotonie et des défauts de conduction cardiaque	(Mahadevan et al., 2006)
Restauration de l'expression de MBNL1	Surexpression de MBNL1 médiée par une infection virale au niveau du muscle	HSA <sup>LR</sup>	Distribution diffuse de MBNL1	Réversion des défauts d'épissage	Correction de la myotonie	(Kanadia et al., 2006)
	Surexpression de MBNL1, via un croisement avec une lignée surexprimant MBNL1	HSA <sup>LR</sup>	Foci présent dans les souris surexprimant MBNL1	Défauts d'épissage évités	Correction de la myotonie et de la myopathie	(Chamberlain and Ranum, 2012)
Élimination du transcrit toxique (mécanisme inconnu ou médié par la RNase H)	OAS; injection intramusculaire	HSA <sup>LR</sup>	40% de réduction du nombre de foci MBNL1 positif, 50% de réduction du transcrit contenant les expansions CUG	Réversion des défauts d'épissage	Pas de correction de la myotonie	(Mulders et al., 2009)
	OAS; administration générale	HSA <sup>LR</sup>	Plus petits et moins nombreux foci détectés, 80% de réduction de l'ARN contenant les expansions	Réversion des défauts d'épissage	Correction prolongée de la myotonie	(Wheeler et al., 2012)
	OAS; infection	<i>In-vitro</i> : human DM1 myoblasts	N/D	N/D	Restauration of DM1 myoblast differentiation and glucose uptake; CELF1 normal expression	(Furling et al., 2003)
	OAS; infection	<i>In-vitro</i> : human DM1 myoblasts	Réduction du nombre de foci par cellules	Réversion des défauts d'épissage	Restauration de la différenciation des cellules musculaires	(Francois et al., 2011)
Blocage de l'accès au répétitions aux protéines liant l'ARN	OAS; injection intramusculaire	HSA <sup>LR</sup>	Réduction du nombre de foci, 50% de réduction du transcrit contenant les expansions	Réversion des défauts d'épissage	Correction de la myotonie	(Wheeler et al., 2009)
	Pentamidine, injection i.p	HSA <sup>LR</sup>	Réduction <i>in-vitro</i> du nombre de foci	Réversion partielle des défauts d'épissage	N/D	(Warf et al., 2009)

**Tableau IV.1. Exemples de stratégies thérapeutiques.** Le tableau présente quelques exemples des stratégies développées pour cibler l'ARN toxique dans la DM1. OAS : oligonucléotides antisens. N/A : non-applicable. N/D : Non déterminé. i.p. : intrapéritonéale.



#### IV.4. Défi thérapeutique d'aujourd'hui

L'ensemble des stratégies décrites améliore toutes d'une manière ou d'une autre le phénotype DM1. Cependant, elles ne concernent que les muscles, à l'image de la stratégie OAS sur le modèle *HSA<sup>LR</sup>* qui corrige de manière prolongée la myotonie (Wheeler et al., 2012). Or, la DM1 est une pathologie qui affecte beaucoup de tissus, incluant le SNC et le cœur. L'administration, la biodistribution et la stabilité de ces molécules thérapeutiques doivent être améliorées pour leur permettre d'atteindre tous les tissus affectés. Il serait donc intéressant de tester l'effet de l'injection subcutanée des AOS déjà développés (Wheeler et al., 2012) sur un modèle animal reproduisant le caractère multisystémique de la DM1.

### V. MECANISMES DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Bien étudié dans les muscles et le cœur des patients DM1, le mécanisme pathologique est moins bien investi dans le SNC des patients, qui présentent une atteinte neurologique handicapante. Les études concernant le SNC des patients DM1 se sont principalement concentrées sur deux régions: le cortex frontal et le tronc cérébral. Ces deux régions sont en effet pertinentes par leurs fonctions et leurs possibles implications dans des manifestations neurologiques, altérées chez des patients DM1 : pendant que le cortex frontal est impliqué dans les tâches exécutives (Robbins and Arnsten, 2009), le tronc cérébral est impliqué dans le control du cycle du sommeil, respiratoire et les fonctions cardiaques (Izac and Eeg, 2006). Malgré des avancées récentes, le mécanisme derrière les anomalies neurologiques dans la DM1 n'est pas entièrement compris, et il reste des régions du cerveau, susceptibles d'être impliquées dans la neuropathogenèse, à explorer.

#### V.1. Modifications histopathologiques

Plusieurs anomalies au niveau du cerveau des patients DM1 ont été détectées. Une perte cellulaire au niveau du tronc cérébral a été rapportée, particulièrement chez les patients souffrant d'hypersomnie excessive et d'hypoventilation, suggérant que ces symptômes cliniques reflètent une dégénération et/ou une dysfonction des zones du cerveau impliquées dans le contrôle du sommeil. D'autres anomalies histopathologiques incluent une atrophie du cerveau, une perte cellulaire dans le cervelet, des inclusions neuronales cytoplasmiques, des agrégats positifs pour l'ubiquitine, des inclusions

neurofibrillaires et une migration neuronale perturbée (Giubilei et al., 1999 ; Mizukami et al., 1999 ; Ono et al., 1995 ; Ono et al., 1998 ; Vermersch et al., 1996).

## V.2. Anomalies de structure

Plus récemment, des études d'imagerie ont révélé des anomalies de structures de la matière grise et blanche dans des régions spécifiques du cerveau, comme le cortex frontal, qui peut contribuer à la dysfonction exécutive caractéristique de la DM1 (Minnerop et al., 2011 ; Romeo et al., 2010; Weber et al., 2010 ). Dans les formes congénitales et juvéniles de la DM1, l'étendue anormale de lésions au sein de la matière blanche corrèle avec les dysfonctions cognitives (Wozniak et al., 2011). Une réduction de l'intégrité de la matière blanche et du volume de la matière grise a été détectée par imagerie sur des patients DM1 à l'âge adulte (Franc et al., 2012).

## V.3. Altérations métaboliques

En plus de ces anomalies de structure, une altération du métabolisme du glucose dans le cerveau ainsi qu'une hypoperfusion ont été rapportées dans le SNC des patients DM1 par des techniques d'imagerie cérébrale : PET (*Positron Emission Tomography*) et SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*) (Chang et al., 1993 ; Meola et al., 1999 ; Minnerop et al., 2011).

## V.4. Anomalies moléculaires

En 2004, des foci contenant l'ARN *DMPK* amplifié ont été détectés dans le noyau de neurones corticaux et subcorticaux de patients DM1. *MBNL1* et *MBNL2* sont trouvées séquestrées dans ces foci ribonucléaires, altérant alors l'épissage alternatif de plusieurs transcrits (Jiang et al., 2004). L'épissage anormal de *MAPT/Tau* provoque l'accumulation des isoformes pathologiques dans le cerveau *post-mortem* de patients DM1 (Sergeant et al., 2001), où il avait aussi été détecté l'accumulation d'agrégats neurofibrillaires caractéristiques des tauopathies (Vermersch et al., 1996). Plus récemment, d'autres anomalies de l'épissage alternatif ont été décrites dans différentes régions du cerveau des patients DM1 (Charizanis et al., 2012 ; Dhaenens et al., 2011 ; Hernandez-Hernandez et al., 2013b ; Hernandez-

Hernandez et al., 2013a ; Suenaga et al., 2012). De plus, il a été rapporté une altération du niveau d'expression de CELF2 dans le cerveau des patients DM1 (Dhaenens et al., 2011 ; Hernandez-Hernandez et al., 2013a). Enfin, des anomalies d'expression de deux membres de la famille SLITRK ont été décrites dans des cellules neuronales DM1 et dans le cerveau de patients DM1, pouvant contribuer aux défauts de formation des neurites et des synapses au niveau des jonctions neuromusculaires dans la DM1 (Marteyn et al., 2011).

## VI. LES SOURIS DMSXL: UN MODELE MULTISYSTEMIQUE DE LA DM1

Pour étudier les conséquences pathophysiologiques des expansions CTG répétées mais aussi le mécanisme moléculaire de l'instabilité des triplets répétés, il a été généré au sein du laboratoire un modèle murin de la DM1.

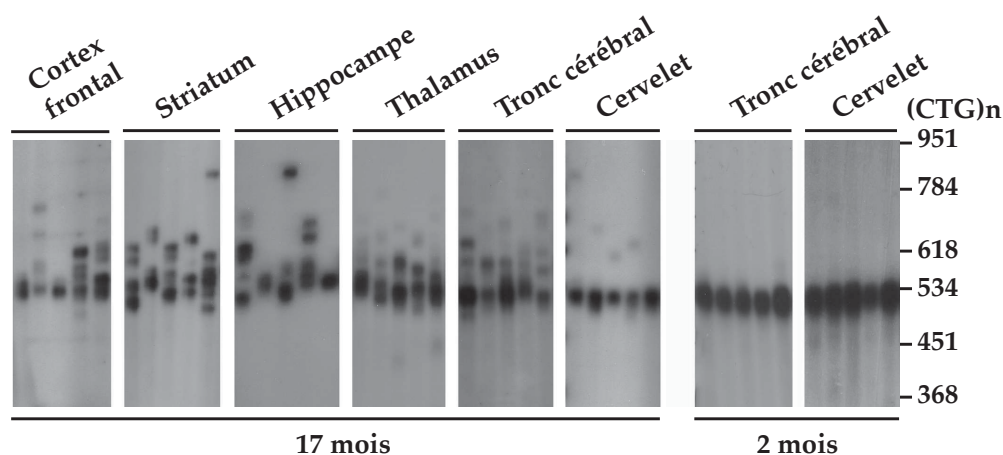
### VI.1. Le transgène utilisé

Les lignées murines transgéniques générées sont porteuses d'un large fragment de 45 kb d'ADN génomique humain, dérivé du locus DM1 humain. En effet, le fragment génomique contient le gène *DMPK*, ainsi qu'en partie les gènes *DMWD* et *SIX5*, avec différentes tailles pour les expansions CTG localisées dans la partie 3'UTR de *DMPK*. Les lignées transgéniques portent soit une courte séquence (CTG)<sub>20</sub>, soit une séquence plus longue (CTG)<sub>300</sub>, respectivement nommée DM20 et DM300 (Gourdon et al., 1997 ; Seznec et al., 2001).

### VI.2. Instabilité des répétitions

Les lignées transgéniques DM300 ont montré une instabilité intergénérationnelle biaisée à 90% vers les expansions (Seznec et al., 2000). C'est ainsi que des grands sauts dans le nombre des répétitions pendant les transmissions intergénérationnelles ont donné lieu aux souris DMSXL, porteuses de larges expansions avec plus de 1000 répétitions (Gomes-Pereira et al., 2007). Ce modèle est donc le seul à reproduire l'instabilité intergénérationnelle si caractéristique de la DM1. Ces souris porteuses de grandes expansions CTG présentent aussi une instabilité somatique biaisée vers les expansions, dépendant de l'âge et tissu spécifique (Lia et al., 1998 ; Seznec et al., 2000). A côté des tissus comme le quadriceps, le cœur ou le pancréas, le SNC présente aussi un phénomène d'instabilité somatique positivement corrélée avec l'âge des souris et variable d'une

région cérébrale à une autre (Figure VI.1.). En effet, l'instabilité est plus importante dans le cortex frontal, le tronc cérébral et l'hippocampe (par exemple), en comparaison avec le cervelet.



**Figure VI.1. Instabilité somatique au sein du SNC des souris DM300.** L'analyse des souris âgées de 17 mois en comparaison avec des souris DM300 âgée de deux mois montre clairement une augmentation de la mosaïque somatique de la souris avec l'âge.

Afin de mieux comprendre le mécanisme derrière le phénomène d'instabilité observée, les souris DM300 ont été croisées avec des souris déficientes pour différents acteurs du métabolisme de l'ADN, notamment des lignées déficientes pour différents partenaires du système MMR. Ces croisements ont révélé que l'expansion intergénérationnelle et somatique des séquences CTG répétées nécessitait un système MMR fonctionnel (Foiry et al., 2006 ; Savouret et al., 2004 ; Tome et al., 2009 ; Savouret et al., 2003).

### VI.3. Phénotype multisystémique

Les souris DM300 et DMSXL expriment les transcrits *DMPK* mutés sous le contrôle du promoteur humain dans un grand nombre de tissus. C'est le seul modèle murin à exprimer les expansions CTG au sein du SNC. Les souris DM300 et DMSXL présentent aussi l'avantage d'exprimer *DMPK* avec un profil d'expression qui se rapproche de la situation humaine mais qui mime également le profil d'expression de *Dmpk*. En effet, le niveau d'ARN *DMPK* dans les tissus est plus important dans le cœur et les muscles squelettiques, à l'image de l'expression de l'endogène *Dmpk*. Le niveau du transcrit *Dmpk* endogène est environ trois fois supérieurs à celui du transgène *DMPK* dans le cœur. Au contraire, le niveau du transcrit *DMPK* amplifié est trois fois supérieur à celui du gène murin dans le cortex frontal et le cervelet des souris transgéniques (Huguet et al., 2012). L'expression de l'antisens *DMPK* a été

aussi détectée dans les souris DM1, principalement dans le cœur, à l'image de la situation humaine (Huguet et al., 2012).

Les souris DM300 et DMSXL homozygotes produisent assez de transcrits toxiques porteurs des répétitions CUG pour développer un phénotype multisystémique, en résultat de l'expression du transgène *DMPK* dans multiples tissus. Les caractéristiques moléculaires associés à la toxicité des ARNs, notamment l'accumulation des foci, sont néanmoins plus marquées dans les souris DMSXL porteurs de tailles CTG plus importantes. Au niveau du SNC, la distribution des foci d'ARN nucléaires est variable selon les régions : le cortex frontal et certains noyaux du tronc cérébral montrent le plus grand nombre de foci (Hernandez-Hernandez et al., 2013a). L'accumulation de foci d'ARN nucléaires et les défauts d'épissage alternatif modérés dans les souris DMSXL, sont associées à une forte mortalité, un retard de croissance ainsi que des défauts musculaires, à l'image d'anomalies histopathologiques, d'une réduction de la force musculaire et de plus faibles performances motrices (Huguet et al., 2012). Les souris DMSXL développent également des anomalies histopathologiques du diaphragme pouvant contribuer à l'altération de la fonction respiratoire observée (Panaite et al., 2013). Egalement, des anomalies des jonctions neuromusculaires au niveau de la patte arrière ont été détectées au sein des souris DMSXL, suggérant une neuropathie périphérique (Panaite et al., 2011).

Enfin, ce modèle murin de la DM1 présente aussi certaines anomalies de comportement semblables à celles observées chez les patients DM1. En effet, les souris DMSXL ont montré une baisse de l'activité exploratrice après le transfert dans une arène dite « *open-field* », associée à une anxiété augmentée. De plus, elles présentent une altération de la mémoire spatiale, comparable à ce qui est observé les patients DM1. Enfin, l'anhédonie préalablement décrite chez les patients DM1, a aussi été détectée chez les souris DMSXL (Hernandez-Hernandez et al., 2013a).

Des anomalies électrophysiologiques ont également été observées au sein de l'hippocampe des souris DMSXL, région présentant une accumulation élevée de foci d'ARN et des défauts d'épissage. Un déficit de la plasticité synaptique à court terme a été détecté dans les souris DMSXL et est associée à la surexpression de RAB3A et l'hyperphosphorylation de la Synapsin 1 (Hernandez-Hernandez et al., 2013a).

Ce modèle DM1, unique en son genre, reproduit non seulement l'instabilité intergénérationnelle et somatique, caractéristique de la DM1, mais aussi un phénotype musculaire et neurologique. Il est donc un outil puissant pour étudier entre autres l'impact des expansions CTG sur le SNC.

## VII. CONCLUSION

La toxicité de l'ARN, mécanisme pathologique majeur décrit dans la DM1, résulte en l'altération de l'épissage alternatif de nombreux transcrits, faisant de cette pathologie une splicéopathie. Cependant, cette caractéristique mécanistique n'explique pas tout le profil multisystémique de la pathologie. Il s'avère que les bases moléculaires de la DM1 consistent aussi en des changements de la transcription et de la traduction, une potentielle protéotoxicité et une dérégulation des voies miARNs et siARNs. En effet, la compréhension du mécanisme d'autres pathologies à triplets répétés a permis de proposer que la production d'homopolymères, entre autres par la traduction RAN, pouvait impliquer une protéotoxicité, nouvel acteur de la pathogenèse de maladies à toxicité ARN. Et inversement, un rôle toxique des ARNs a été proposé comme participant au mécanisme pathologique de maladie connu pour étant exclusivement causé par une toxicité protéique.

Ainsi, la complexité mécanistique de la DM1 est à la hauteur de celles des symptômes. L'avancée dans la compréhension des bases moléculaires de la DM1, couplées avec les progrès réalisés dans le développement de molécules pour cibler l'ARN *in vivo*, a ouvert de nouvelles perspectives pour le développement de stratégies thérapeutiques. Le succès pré-clinique de certaines stratégies sur les modèles murins DM1 est remarquable et nous rapproche de plus en plus des essais cliniques sur l'homme. Cependant, ces molécules doivent encore surmonter quelques obstacles, comme l'accès au SNC régulé par la barrière hémato-encéphalique. La recherche de composés chimiques plus performant dans leur activité, leur durée de vie, leur biodistribution et leur faible toxicité est essentielle pour améliorer la puissance des stratégies thérapeutiques dans la DM1 mais aussi dans d'autres maladies avec un gain de fonction ARN toxique.

# Myotonic dystrophy, when simple repeats reveal complex pathogenic entities: new findings and future challenges

Géraldine Sicot, Geneviève Gourdon and Mário Gomes-Pereira\*

INSERM U781, Université Paris Descartes, Hôpital Necker Enfants Malades, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15, France

Received June 30, 2011; Revised June 30, 2011; Accepted August 2, 2011

**Expanded, non-coding RNAs can exhibit a deleterious gain-of-function causing human disease through abnormal interactions with RNA-binding proteins. Myotonic dystrophy (DM), the prototypical example of an RNA-dominant disorder, is mediated by trinucleotide repeat-containing transcripts that deregulate alternative splicing. Spliceopathy has therefore been a major focus of DM research. However, changes in gene expression, protein translation and micro-RNA metabolism may also contribute to disease pathology. The exciting finding of bidirectional transcription and non-conventional RNA translation of trinucleotide repeat sequences points to a new scenario, in which DM is not mediated by one single expanded RNA transcript, but involves multiple pathogenic elements and pathways. The study of the growing number of human diseases associated with toxic repeat-containing transcripts provides important insight into the understanding of the complex pathways of RNA toxicity. This review describes some of the recent advances in the understanding of the molecular mechanisms behind DM and other RNA-dominant disorders.**

## INTRODUCTION

Myotonic dystrophy (DM), a paradigm disease of RNA toxicity, is caused by a non-coding mutation. Toxic RNA transcripts accumulate in nuclear inclusions, interfering with the activity, localization and/or steady-state levels of RNA-interacting proteins. The most broadly accepted mechanism of disease predicts that toxic RNAs deregulate the splicing programme of a subset of developmentally regulated genes in multiple tissues, resulting in a truly multisystemic condition (1). However, recent findings suggest that DM molecular pathogenesis may be vastly more complex, going beyond spliceopathy, involving changes in gene expression and translation efficiency, antisense transcripts, non-conventional translation and micro-RNA (miRNA) deregulation. In this review, we will discuss these fascinating findings and their implications for the understanding of DM and other toxic RNA diseases.

## DM: PARADIGM OF RNA TOXICITY

DM is a highly multisystemic neuromuscular disease characterized by a wide range of clinical manifestations, such as

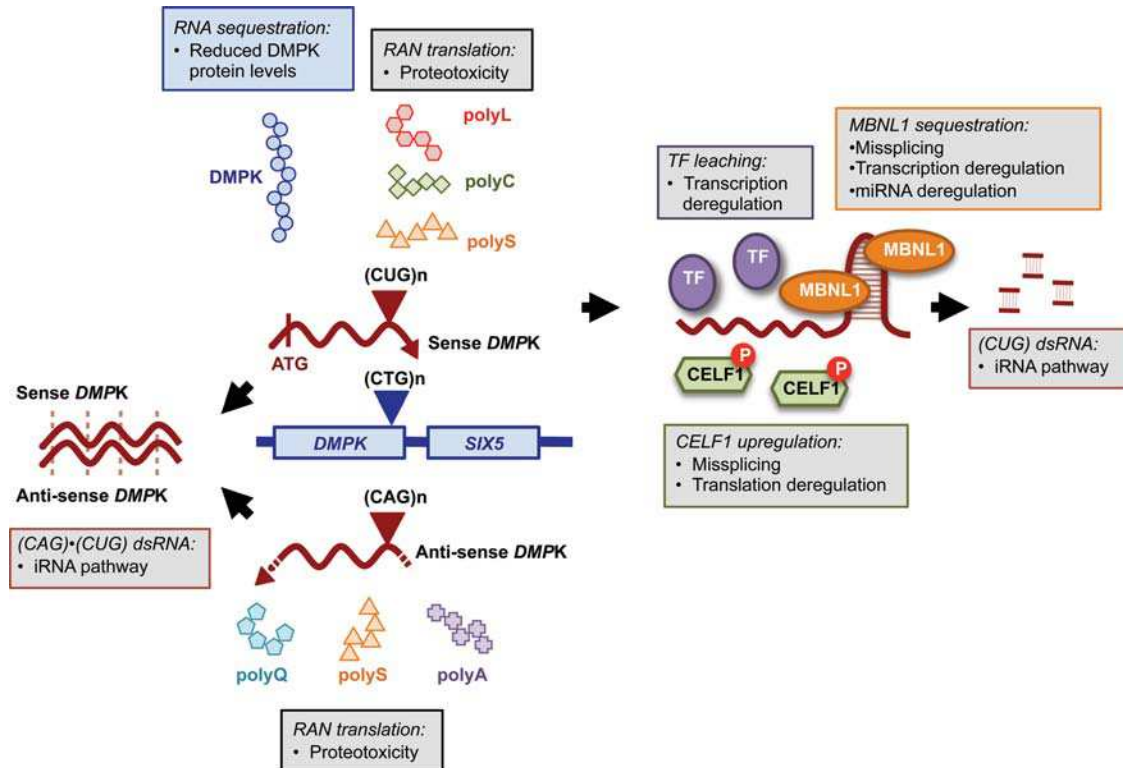
myotonia, muscle weakness and wasting, cardiac arrhythmias, cognitive and behavioural deficits, lens opacities, insulin resistance and other variable symptoms (2). Two DM loci are associated with two types of the disease. DM type 1 (DM1) is caused by the expansion of an unstable CTG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of the DM protein kinase (*DMPK*) gene (3,4). The DM type 2 (DM2) mutation consists in the expansion of an unstable CCTG tetranucleotide within the first intron of the CCHC-type zinc finger, nucleic acid-binding protein (*CNBP*) gene (previously named myotonia) (5).

Longer CTG repeat expansions are associated with more severe symptoms and earlier disease onset (6). Nevertheless, the size of the repeat *per se* cannot explain disease variability, as illustrated by the clinical variability introduced by the presence of sequence interruptions within the DM1 CTG repeat tract (7,8).

Expanded CTG DNA repeats are highly dynamic, showing a marked tendency to further repeat gain in intergenerational transmissions and in somatic cells (reviewed in 9). The CCTG repeat is also unstable in the germline and somatic tissues (5).

Although genetically distinct, DM1 and DM2 share a common pathogenic mechanism.

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 140615334; Fax: +33 140615445; Email: mario.pereira@inserm.fr



**Figure 1.** Molecular pathogenesis of DM1: mechanisms of RNA toxicity, spliceopathy, deregulation of gene expression and proteotoxicity. The expanded *DMPK* gene is transcribed into sense and anti-sense transcripts. CUG-containing *DMPK* transcripts form alternative RNA structures and accumulate in the nucleus of DM1 cells, resulting in reduced DMPK protein levels. Loss of function of MBNL1 (and other members of the MBNL protein family), through sequestration into RNA foci, deregulates not only alternative splicing, but also transcription and miRNA metabolism. CELF1 hyperphosphorylation and upregulation affect alternative splicing and translation efficiency. Leaching of transcription factors (TF) by expanded *DMPK* transcripts may mediate changes in gene expression. iRNA pathways might be activated by the processing of dsRNA structures, which can result from the folding of CUG-containing transcripts into hairpin structures, or from the hybridization of complementary sense and anti-sense *DMPK* transcripts. Both sense and anti-sense *DMPK* transcripts might be RAN-translated in all possible reading frames generating homopolymers, which might be deleterious to the cell.

### Mechanisms of DM spliceopathy

Experimental evidence supports an RNA gain-of-function mechanism of expanded transcripts in DM1 and DM2 (1,10,11). Expanded CUG-containing transcripts interfere with RNA–protein interactions, resulting in decreased muscleblind (MBNL) and increased CUGBP/Elav-like family member 1 (CELF1) activities. MBNL proteins are depleted from the nucleoplasm through recruitment into ribonuclear foci (12–14). CELF1 stabilization by PKC phosphorylation results in increased steady-state levels and protein upregulation (15). A combined effect of decreased MBNL and increased CELF1 activity disrupts a tightly regulated developmental programme, leading to inappropriate expression of embryonic splicing isoforms in adult tissues (1,10) (Fig. 1). hnRNP H is also increased in DM1 cells, possibly contributing to the missplicing of target genes (16). In DM2, splicing abnormalities (1,17) are also associated with the sequestration of MBNL proteins by expanded transcripts (18). Although not detected in DM2 muscle biopsies (13), CELF1 is upregulated in the liver of DM2 transgenic mice (19).

### RNA toxicity in other repeat expansion disorders

The molecular pathogenesis of spinocerebellar type 8 (SCA8), SCA10, SCA12, Huntington disease like 2 (HDL2) and fragile

X tremor ataxia syndrome (FXTAS) likely involve toxic RNAs and abnormal RNA–protein interactions (Table 1).

The SCA8 CAG•CTG expansion is bi-directionally expressed. The CAG-containing *ATXN8* transcript produces polyglutamine tracts (20). As in DM1, the CUG-containing antisense *ATXN8OS* transcripts accumulate in nuclear foci, sequestering MBNL1 in selected neuronal populations and affecting alternative splicing and gene expression (21). The precise contribution of the polyglutamine peptide and the CUG toxicity to SCA8 pathology remains to be determined.

In FXTAS and HDL2, MBNL1 is also sequestered into intranuclear RNA inclusions, resulting in abnormal splicing (22–24). The recruitment of RNA-interacting proteins (Pur $\alpha$ , hnRNP A2/B1 and Sam68) into FXTAS RNA inclusions might also contribute to disease (23,25,26). RNA toxicity in FXTAS is corroborated by the neuropathology of mice expressing CGG repeats within the murine *Fmr1* context (27,28) or in an unrelated gene (29).

SCA10 patients and transgenic mice expressing intronic ATTCT expansions in an unrelated gene accumulate nuclear and cytoplasmic foci. hnRNP K sequestration and loss of function disrupt RNA splicing (30), supporting a *trans*-dominant role of AUUCU RNA repeats. A toxic effect of non-coding CAG repeats has also been proposed in SCA12 (31,32).



**Table 1.** Toxic RNA diseases, protein recruitment to RNA foci and splicing abnormalities

Disease	RNA foci	Protein co-localization	CELF1	Missplicing	References
DM1	Nuclear	MBNL1 MBNL2 MBNL3 hnRNP H	Upregulated	Yes	(1,10,16,18,81,82)
DM2	Nuclear	MBNL1 MBNL2 MBNL3	Conflicting results	Yes	(1,5,13,18,19,79)
FXTAS	Nuclear	MBNL1 Sam68 hnRNP A2/B1 Pur $\alpha$	N/D	Yes	(23,26,83)
SCA8	Nuclear	MBNL1	N/D	Yes	(21)
SCA10	Nuclear	hnRNP K	N/D	Yes	(30)
SCA12	Cytoplasmic N/D	N/D	N/D	N/D	(31)

N/D, not determined.

In spite of shared key elements, the detailed mechanisms of RNA toxicity likely differ between individual repeat expansion disorders.

### Toxic CAG repeats: it is not all about polyglutamines

Disease-causing CAG expansions are usually located within open-reading frames and result in a toxic gain-of-function of the expanded polyglutamine tract (33). The eye and neurological phenotypes of transgenic *Drosophila* expressing untranslated CAG-containing transcripts brought a new pathogenic element on stage: toxic CAG RNA repeats (34). CAG RNA can form small foci in a limited number of cells without affecting alternative splicing (34,35). MBNL1 interacts with CAG repeats and is sequestered into RNA foci in culture (35). In contrast to CUG toxicity, MBNL1 overexpression enhances CAG toxicity in CAG-expressing transgenic flies, whereas muscleblind deletion prolongs their lifespan (34). Given the protective effect of MBNL1 upregulation in DM1 transgenic mice expressing CUG repeats (36), these results suggest that different mechanisms operate in CUG and CAG RNA toxicity. It is conceivable that MBNL1 stabilizes CAG-containing pathogenic transcripts, increasing the steady-state levels of polyglutamine peptides.

The introduction of CAA interruptions within the expanded CAG sequence mitigates RNA toxicity in flies and abolishes phenotype enhancement by MBNL1 overexpression (34). These results are in line with a pathogenic role of the alternative structures adopted by pure CAG tracts, which may participate in deleterious protein–RNA interactions.

### BREAKING THE RULES: ANTI-SENSE TRANSCRIPTION AND NON-CANONICAL TRANSLATION

The far-reaching consequences of the DM1 repeat expansion on cell biology have been illustrated by some exciting findings, which suggest that simple repeats are in fact increasingly complex.

### Anti-sense *DMPK* transcription

Natural anti-sense transcripts are transcribed from the opposite DNA strand to a sense, usually protein-coding, strand and overlap in part with sense RNA. Both sense and antisense RNAs can encode proteins or be non-coding transcripts. In the mammalian genome, the most prominent form of anti-sense transcripts is a non-coding RNA partner of a protein-coding sense transcript (37). It is estimated that >70% of the mammalian genome is transcribed in both sense and anti-sense strands (38). Recently, anti-sense transcripts have been implicated in diverse transcriptional and post-transcriptional gene regulatory mechanisms operating in a wide variety of biological functions, such as the regulation of transcription, RNA–DNA interactions, RNA–RNA interactions in the nucleus, as well as RNA–RNA interactions in the cytoplasm.

In DM1, an anti-sense *DMPK* transcript emanating from the adjacent *SIX5* regulatory region has been described (39). This anti-sense transcript extends into the insulator element described in the 3' region of *DMPK*, located between *DMPK* and *SIX5*. It has been proposed that the processing of anti-sense *DMPK* RNA into 21-nucleotide fragments might be involved in the regulation of the environmental chromatin structure. At the wild-type DM1 locus, CTCF-binding sites located on each side of the CTG repeat restrict the extent of the anti-sense RNA. In contrast, in congenital DM1 fibroblasts, the expanded allele is associated with loss of CTCF binding, spread of heterochromatin and regional CpG methylation. An attractive hypothesis resulting from this work is that insulator loss of function, due to impaired CTCF binding, results in higher *DMPK* expression in late embryogenesis, as a consequence of the high *SIX5* enhancer activity, thereby contributing to the earlier disease phenotype in congenital DM1.

Recently, bidirectional transcription of (CTG) $\bullet$ (CAG) repeat expansions was shown to stimulate repeat instability in human fibroblasts carrying 800 CTG (40), implying a contribution to somatic instability of highly expanded (CTG) $\bullet$ (CAG) repeats.

Identification of anti-sense transcripts and CTCF-binding sites flanking (CTG) $\bullet$ (CAG) repeats at other disease loci suggests that the features described at the DM1 locus might be present at other repeat-associated loci in the genome (41–43).

**Table 2.** miRNA and DM1 pathophysiology

mi-RNA	Physiological roles	Deregulation in DM1 tissues	References
miR-1 (miR-1a, miR-1b)	Myogenesis Cardiogenesis Control of cardiac conduction Inhibition of proliferation	Possible upregulation in DM1 skeletal muscle (conflicting results) Downregulation in DM1 heart Altered subcellular localization in DM1 myofibres	(56–58)
miR-29b, miR-29c miR-33	Cardiac adaption to stress Cholesterol metabolism Cell proliferation	Downregulation in DM1 skeletal muscle Downregulation in DM1 skeletal muscle	(56) (56,84)
miR-133 (miR-133a, miR-133b)	Myogenesis Control of cardiac conduction Muscle hypertrophy Apoptosis	Altered subcellular localization of miR-133b in skeletal muscle	(56)
miR-206	Myogenesis	Upregulation in DM1 skeletal muscle Altered subcellular localization in DM1 myofibres	(56,57)
miR-335	Muscle regeneration	Upregulation in DM1 skeletal muscle	(56)

### Repeat-associated non-ATG translation

The non-canonical RNA translation of trinucleotide repeat-expanded transcripts unveiled other potential pathogenic entities. Repeat-associated non-ATG (RAN) translation occurs independently of an ATG initiation codon in all reading frames. RAN translation operates on CAG-containing transcripts to produce polyglutamine, polyserine and polyalanine homopolymeric peptides. RAN-translated peptides were detected in SCA8 mouse models and in the human cerebellum. In addition, antisense *DMPK* transcripts can also be RAN-translated to generate polyglutamine homopolymeric peptides in DM1 mouse models and in DM1 myoblasts, skeletal muscle and leucocytes (44). It is also possible that sense *DMPK* transcripts are RAN-translated to generate long polyleucine, polycysteine and polyalanine tracts (45) (Fig. 1). RAN translation can also operate on CAG repeats embedded in the HD, HDL2 and SCA3 flanking context (44).

The mechanism of RAN translation, as well as its contribution to disease, require future studies. The question is particularly challenging given the confounding and simultaneous effects of RNA and protein toxicity in the cell. In the case of SCA8, for instance, it will be important to distinguish between proteotoxicity resulting from orthodox ATG-dependent polyglutamine translation and proteotoxicity resulting from RAN-translated homopolymers. Preliminary evidence of a possible pathogenic role comes from the co-localization of RAN-translated peptides with indicators of apoptosis in transfected cells and transgenic DM1 mice (44). Cell culture and transgenic mouse model systems will help address these and other questions.

### THE DM WORLD BEYOND SPLICEOPATHY

Misregulation of alternative splicing plays a central role in the development of important DM1 symptoms (1,10). However, DM1 mutation can affect gene expression in multiple ways. First, although primarily considered splicing regulators, MBNL and CELF proteins participate in mRNA transport, stability and translation (46,47). Their altered activity and/or localization in DM1 cells may alter transcription, translation and cell signalling. Second, the expanded CTG transcripts

may affect the levels, availability and subcellular localization of transcription factors. Third, the disease may disturb highly regulated pathways of miRNA and double-stranded RNA processing (Fig. 1).

### Deregulation of transcriptional factors

The effects of repeat expansion on gene expression were revealed by microarray analysis of DM1 and DM2 muscle biopsies (48), and confirmed by the mRNA profiling of transgenic mice expressing non-coding CUG repeats in skeletal muscle. Interestingly, most of the changes detected were also found in *Mbnl1* knock-out mice, indicating that transcriptional deregulation results, at least partially, from MBNL1 loss of function (49).

Altered gene expression may also result from a direct effect of the repeat expansion on transcription factors. Expanded *DMPK* transcripts bind SP1 and RAR $\gamma$  in DM1 myocytes, leaching them out of the chromatin, reducing their availability and the expression of target transcripts (50). NKX2-5 upregulation in DM1 skeletal muscle and heart affects the expression of downstream genes, possibly contributing to the muscle regenerative defects and cardiac conduction abnormalities (51). The mislocalization of SHARP (SMART/HDAC1-associated repressor protein) in the cytoplasm in DM1 myoblasts may alter the steady-state levels of a set of RNA transcripts implicated in muscle development and function (52).

The absence of co-localization of transcription factors with CUG-containing nuclear foci does not exclude a pathogenic role. It is conceivable that a fraction of expanded *DMPK* transcripts does not aggregate and remains soluble in DM1 cells, interacting with splicing regulators and transcription factors, thereby contributing to pathology (53). To this respect, it would be interesting to determine the extent of the soluble fraction of expanded *DMPK* transcripts and explore their pathogenic interactions.

### miRNAs deregulation

MicroRNA deregulation can participate in muscular dystrophy and cardiomyopathies (54,55). In DM1, miRNAs appear to be affected in skeletal muscle and heart tissue (Table 2) (56–58).

Interestingly, mi-R1 downregulation in DM1 and DM2 hearts is mediated by the functional depletion of MBNL1, which affects the misprocessing of pre-miR-1 (58). Whether MBNL1 regulates the processing of other miRNAs remains to be determined.

DM-associated miRNA deregulation alters the expression of target transcripts, possibly contributing to disease pathology (56,58). The investigation of additional targets will help evaluate the pathophysiological impact of miRNA deregulation in DM1 skeletal muscle, heart and other tissues. It is noteworthy that some miRNAs deregulated in DM1 have also been identified in Duchenne muscular dystrophy and other muscular disorders (54), raising questions about the causative-consequential relationship between miRNA metabolism and muscular pathology.

miRNA changes have also been reported in other trinucleotide expansion disorders, such as Huntington disease (59) and SCA1 (60). The detailed understanding of the role of miRNAs in human disease will open new routes for their therapeutic manipulation.

### RNA interference and double-stranded RNA pathways

In DM1 cells, CUG-containing RNAs form imperfect hairpin structures, which can be cleaved by the RNA interference (RNAi) machinery to generate CUG-containing small interference RNAs (siRNAs). CUG-derived siRNAs are capable of binding complementary sequences in target mRNAs, possibly interfering with their expression and contributing to disease pathogenesis (61). In contrast to the generation of siRNAs by hairpin-forming CUG RNA transcripts alone, the requirement of simultaneous expression of CUG and CAG has been suggested, following the development of transgenic DM1 *Drosophila*. The expression of non-coding CTG repeats in flies results in nuclear RNA foci accumulation, missplicing and eye phenotypes. The phenotype is enhanced by the co-expression of non-coding CUG and CAG expansions, supporting a pathogenic role for CUG and CAG interaction mediated by RNAi pathways. Co-expressed CUG and CAG-containing transcripts are processed into small triplet repeat-derived siRNAs capable of targeting downstream transcripts containing small CUG or CAG stretches (62). Blocking siRNA biogenesis alleviates repeat toxicity in flies co-expressing CUG and CAG RNA repeats.

In addition to the regulation of local chromatin reorganization and gene expression in the DM1 locus (39), anti-sense *DMPK* transcripts may act as *trans*-modifiers of the expression of other genes, through the activation of RNAi pathways, contributing to disease pathogenesis. RNAi targets relevant to DM1 pathogenesis remain to be identified.

### Looking outside the nucleus: cell stress and translation inhibition

DM1 molecular pathogenesis may not be confined to the nucleus. CELF1-overexpressing mice recreate abnormal steady-state levels of MEF2A and p21 found in DM1 skeletal muscle (63), suggesting that CELF1 upregulation contributes to disease not only through splicing disruption in the nucleus, but also through stress-induced inhibition of

translation in the cytoplasm (64). Cell stress and associated repression of protein translation may be relevant to the disease phenotype. In line with this view, polyubiquitin/proteasome stress-signalling pathways are activated in the skeletal muscle of a transgenic DM1 mouse model, showing progressive muscle atrophy (65).

Interestingly, MBNL1 may also participate in the cytoplasmic response to cell stress, given its accumulation in cytoplasmic stress granules (66). The cytoplasmic aspects of DM1 molecular pathogenesis have probably been overlooked and require additional studies.

## REMAINING QUESTIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

Our understanding of DM1 is improving fast, with the help of transgenic mouse models (11). Nevertheless, there are some key aspects of the disease that deserve further investigation.

### Disease mechanisms in CNS

The neurological manifestations of DM1 have a dramatic impact on the quality of life, but this aspect of the disease was overlooked in the past. Our understanding of DM1 neuropathophysiology is falling behind, when compared with muscle and cardiac manifestations.

Expanded *DMPK* transcripts accumulate in the nucleus of cortical and subcortical neurons, sequestering MBNL1 and disrupting alternative splicing (12). MAPT/TAU missplicing results in the accumulation of pathological protein isoforms (67), which are usually hyperphosphorylated and accumulate in neurofibrillary tangles (68), supporting the classification of DM1 as a tauopathy. The pathophysiological consequences of MAPT/TAU hyperphosphorylation in DM1 require further studies. It is unclear whether brain spliceopathy is sufficient to fully explain DM neurological dysfunction; nor do we know whether the underlying mechanisms of missplicing are shared between the CNS, skeletal muscle and heart.

Other pathways might contribute to brain pathophysiology. Abnormal expression of microtubule-associated proteins (69) and altered functional expression of calcium channels (70) may account for disrupted neurite outgrowth in DM1 neuroblastoma cell models (71). Abnormal neurogenesis has also been reported in pluripotent stem cell lines derived from DM1 embryos, and associated with downregulation of members of the *SLITRK* gene family (72). Transgenic mouse models will help elucidate the contribution of impaired neuronal differentiation to adult and congenital DM1.

In addition to the molecular signs of RNA toxicity, DM brains exhibit structural abnormalities in white and grey matter (73). In adult DM1 and DM2 patients, the parallel analysis of brain structure and cognitive dysfunction suggests that specific region-specific changes might explain neuropsychological deficits (74). In congenital and juvenile DM1, the overall extent of widespread white matter lesions correlates with cognitive dysfunction (75). In addition to structural changes, hypoperfusion and hypometabolism in frontal lobe may contribute to the frontal pattern of cognitive impairment in DM1 (76). Mapping the structural, cellular and metabolic

changes in DM brains, from an early age and throughout disease development, will help the challenging establishment of clinical and physiological correlations between brain abnormalities and neuropsychological manifestations.

### Mechanisms behind the congenital DM1

DM1 patients carrying >500 CTG often develop the severe congenital form of the disease, mainly characterized by general hypotonia at birth and mental retardation. Splicing deregulation has been reported in congenital DM1 (77), but the mechanisms behind this form of the disease require further studies. Although *Mbnl1* knock-out mice did not re-create congenital phenotypes, CELF1 overexpression resulted in embryonic lethality and impaired mouse development (11). A role of CELF1 in congenital DM1 has therefore been suggested. In contrast, normal CELF1 levels in DM2 could explain, at least partially, the possible lack of congenital DM2 (13). Alternatively congenital DM1 might be mediated by increased expression of CUG-containing repeats in early stages of development as a result of the functional loss of the genetic insulator between *DMPK* and the downstream *SIX5* gene (39). Transgenic mice carrying large CTG repeat expansions within the genomic environment of the human DM1 locus (78) express anti-sense *DMPK* transcripts (44) and will help test this hypothesis.

### Differences between DM1 and DM2

Clinical signs in DM1 and DM2 are similar, but there are some distinguishing features: DM2 is generally less severe and lacks a prevalent congenital form. Disease-specific manifestations may result from differences in spatial and temporal expression patterns of *DMPK* and *CNBP* genes. Similarly, changes in the expression of neighbouring genes may define disease-specific manifestations. RNA-interacting proteins may also act as modifiers of disease-specific phenotypes, through different affinities of MBNL1, CELF1 and other RNA-binding proteins for CUG versus CCUG RNA repeats. The role of CELF1 in DM2 is particularly intriguing with contradictory results being reported (13,19,79). It remains possible that CELF1 upregulation depends on the repeat flanking sequence, contributing to the singularity of the DM1 versus DM2.

In the wider context of toxic RNA diseases, the spatial (and temporal) expression profiles of expanded transcripts and their interacting proteins may delineate the susceptibility of specific cell populations to RNA toxicity and define disease-specific pathology.

### Therapy development

Targeting toxic transcripts and their interactions provides a promising therapeutic approach in DM and other toxic RNA diseases (80). Nonetheless, additional strategies can be envisioned (11). As our understanding of the disease improves, it becomes clear that in addition to the reversal of missplicing, correction of gene expression will be required to fully rescue DM1 pathology. The implication of miRNAs, bidirectional transcription, RAN translation and cell stress-associated deregulation of translation in DM1 pathology does not invalidate

neutralization of expanded transcripts. Instead, it imposes a requirement for therapeutic refinement to achieve maximum efficacy.

### CONCLUSIONS

RNA toxicity mediates DM and other microsatellite expansion disorders. Key disease manifestations result from the missplicing of a subset of transcripts. However, spliceopathy may not fully explain the multisystemic disease spectrum. Disease mechanisms likely involve changes in gene transcription and translation.

Our understanding of RNA toxicity is expanding. Additional diseases that fit into the category of dominant toxic RNA disorders are likely to be identified. Recently, a toxic role of RNA transcripts was proposed in diseases previously regarded as entirely mediated by polyglutamine toxicity. Therefore, concomitant pathways of RNA and protein toxicity can operate simultaneously in the cell. Inversely, RAN translation of triplet repeat-containing transcripts implies proteotoxicity in diseases typically mediated by toxic RNA molecules.

In summary, the emerging pathways of molecular pathogenesis are far more complex than previously appreciated, but we believe to be in the right track towards the development of effective therapies.

*Conflict of Interest statement.* None declared.

### FUNDING

Our work is supported by grants from AFM (Association Française contre les Myopathies, France), ANR (Agence Nationale de Recherche, France) and INSERM (Institut National de la Santé et Recherche Médicale, France). G.S. is funded by a PhD fellowship from the French Ministry for Higher Education and Research.

### REFERENCES

1. Ranum, L.P. and Cooper, T.A. (2006) RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu. Rev. Neurosci.*, **29**, 259–277.
2. Harper, P.S. (2001) *Myotonic Dystrophy*. London: WB Saunders.
3. 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*, **69**, 385.
4. 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.
5. 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.
6. Ashizawa, T. and Sarkar, P.S. (2011) Myotonic dystrophy types 1 and 2. *Handb. Clin. Neurol.*, **101**, 193–237.
7. Braida, C., Stefanatos, R.K., Adam, B., Mahajan, N., Smeets, H.J., Niel, F., Goizet, C., Arveiler, B., Koenig, M., Lagier-Tourenne, C. *et al.* (2010) Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational dynamics and likely contribute toward unusual symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 1399–1412.



8. Musova, Z., Mazanec, R., Krepelova, A., Ehler, E., Vales, J., Jaklova, R., Prochazka, T., Koukal, P., Marikova, T., Kraus, J. *et al.* (2009) Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene. *Am. J. Med. Genet. A*, **149A**, 1365–1374.
9. Gomes-Pereira, M. and Monckton, D.G. (2006) Chemical modifiers of unstable expanded simple sequence repeats: what goes up, could come down. *Mutat. Res.*, **598**, 15–34.
10. Osborne, R.J. and Thornton, C.A. (2006) RNA-dominant diseases. *Hum. Mol. Genet.*, **15** (Spec no. 2), R162–R169.
11. Gomes-Pereira, M., Cooper, T.A. and Gourdon, G. (2011) Myotonic dystrophy mouse models: towards rational therapy development. *Trends Mol. Med.*, doi: 10.1016/j.molmed.2011.05.004. Epub ahead of print.
12. Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M.S., Moxley, R.T. and Thornton, C.A. (2004) Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 3079–3088.
13. 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.
14. Mankodi, A., Lin, X., Blaxall, B.C., Swanson, M.S. and Thornton, C.A. (2005) Nuclear RNA foci in the heart in myotonic dystrophy. *Circ. Res.*, **97**, 1152–1155.
15. 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.
16. 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.
17. Savkur, R.S., Philips, A.V., Cooper, T.A., Dalton, J.C., Moseley, M.L., Ranum, L.P. and Day, J.W. (2004) Insulin receptor splicing alteration in myotonic dystrophy type 2. *Am. J. Hum. Genet.*, **74**, 1309–1313.
18. Fardaei, M., Rogers, M.T., Thorpe, H.M., Larkin, K., Hamshere, M.G., Harper, P.S. and Brook, J.D. (2002) Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize *in vivo* with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 805–814.
19. Salisbury, E., Schoser, B., Schneider-Gold, C., Wang, G.L., Huichalaf, C., Jin, B., Siritto, M., Sarkar, P., Krahe, R., Timchenko, N.A. *et al.* (2009) Expression of RNA CCUG repeats dysregulates translation and degradation of proteins in myotonic dystrophy 2 patients. *Am. J. Pathol.*, **175**, 748–762.
20. Moseley, M.L., Zu, T., Ikeda, Y., Gao, W., Mosemiller, A.K., Daughters, R.S., Chen, G., Weatherspoon, M.R., Clark, H.B., Ebner, T.J. *et al.* (2006) Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8. *Nat. Genet.*, **38**, 758–769.
21. Daughters, R.S., Tuttle, D.L., Gao, W., Ikeda, Y., Moseley, M.L., Ebner, T.J., Swanson, M.S. and Ranum, L.P. (2009) RNA gain-of-function in spinocerebellar ataxia type 8. *PLoS Genet.*, **5**, e1000600.
22. Rudnicki, D.D., Holmes, S.E., Lin, M.W., Thornton, C.A., Ross, C.A. and Margolis, R.L. (2007) Huntington's disease-like 2 is associated with CUG repeat-containing RNA foci. *Ann. Neurol.*, **61**, 272–282.
23. Sellier, C., Rau, F., Liu, Y., Tassone, F., Hukema, R.K., Gattoni, R., Schneider, A., Richard, S., Willemsen, R., Elliott, D.J. *et al.* (2010) Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients. *EMBO J.*, **29**, 1248–1261.
24. Tassone, F., Iwahashi, C. and Hagerman, P.J. (2004) FMR1 RNA within the intranuclear inclusions of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *RNA Biol.*, **1**, 103–105.
25. Khalili, K., Del Valle, L., Muralidharan, V., Gault, W.J., Darbinian, N., Otte, J., Meier, E., Johnson, E.M., Daniel, D.C., Kinoshita, Y. *et al.* (2003) Puralpha is essential for postnatal brain development and developmentally coupled cellular proliferation as revealed by genetic inactivation in the mouse. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 6857–6875.
26. Iwahashi, C.K., Yasui, D.H., An, H.J., Greco, C.M., Tassone, F., Nannen, K., Babineau, B., Lebrilla, C.B., Hagerman, R.J. and Hagerman, P.J. (2006) Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS. *Brain*, **129**, 256–271.
27. Brouwer, J.R., Huizer, K., Severijnen, L.A., Hukema, R.K., Berman, R.F., Oostra, B.A. and Willemsen, R. (2008) CGG-repeat length and neuropathological and molecular correlates in a mouse model for fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *J. Neurochem.*, **107**, 1671–1682.
28. Entezam, A., Biacsi, R., Orrison, B., Saha, T., Hoffman, G.E., Grabczyk, E., Nussbaum, R.L. and Usdin, K. (2007) Regional FMRP deficits and large repeat expansions into the full mutation range in a new Fragile X premutation mouse model. *Gene*, **395**, 125–134.
29. Hashem, V., Galloway, J.N., Mori, M., Willemsen, R., Oostra, B.A., Paylor, R. and Nelson, D.L. (2009) Ectopic expression of CGG containing mRNA is neurotoxic in mammals. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 2443–2451.
30. White, M.C., Gao, R., Xu, W., Mandal, S.M., Lim, J.G., Hazra, T.K., Wakamiya, M., Edwards, S.F., Raskin, S., Teive, H.A. *et al.* (2010) Inactivation of hnRNP K by expanded intronic AUUCU repeat induces apoptosis via translocation of PKCdelta to mitochondria in spinocerebellar ataxia 10. *PLoS Genet.*, **6**, e1000984.
31. Holmes, S.E., Hearn, E.O., Ross, C.A. and Margolis, R.L. (2001) SCA12: an unusual mutation leads to an unusual spinocerebellar ataxia. *Brain Res. Bull.*, **56**, 397–403.
32. Ranum, L.P. and Day, J.W. (2004) Pathogenic RNA repeats: an expanding role in genetic disease. *Trends Genet.*, **20**, 506–512.
33. Orr, H.T. and Zoghbi, H.Y. (2007) Trinucleotide repeat disorders. *Annu. Rev. Neurosci.*, **30**, 575–621.
34. Li, L.B., Yu, Z., Teng, X. and Bonini, N.M. (2008) RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*. *Nature*, **453**, 1107–1111.
35. 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.
36. Kanadia, R.N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S.G., Wheeler, T.M., Thornton, C.A. and Swanson, M.S. (2006) Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 11748–11753.
37. Faghihi, M.A. and Wahlestedt, C. (2009) Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 637–643.
38. Katayama, S., Tomaru, Y., Kasukawa, T., Waki, K., Nakanishi, M., Nakamura, M., Nishida, H., Yap, C.C., Suzuki, M., Kawai, J. *et al.* (2005) Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science*, **309**, 1564–1566.
39. Cho, D.H., Thienes, C.P., Mahoney, S.E., Analau, E., Filippova, G.N. and Tapscott, S.J. (2005) Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF. *Mol. Cell*, **20**, 483–489.
40. Nakamori, M., Pearson, C.E. and Thornton, C.A. (2011) Bidirectional transcription stimulates expansion and contraction of expanded (CTG)<sup>n</sup>(CAG) repeats. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 580–588.
41. Batra, R., Charizanis, K. and Swanson, M.S. (2010) Partners in crime: bidirectional transcription in unstable microsatellite disease. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, R77–R82.
42. Dion, V. and Wilson, J.H. (2009) Instability and chromatin structure of expanded trinucleotide repeats. *Trends Genet.*, **25**, 288–297.
43. La Spada, A.R. and Taylor, J.P. (2010) Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 247–258.
44. Zu, T., Gibbens, B., Doty, N.S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M.D., Margolis, J., Peterson, M., Markowski, T.W., Ingram, M.A. *et al.* (2011) Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **108**, 260–265.
45. Pearson, C.E. (2011) Repeat associated non-ATG translation initiation: one DNA, two transcripts, seven reading frames, potentially nine toxic entities! *PLoS Genet.*, **7**, e1002018.
46. Pascual, M., Vicente, M., Monferrer, L. and Artero, R. (2006) The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation*, **74**, 65–80.
47. Barreau, C., Paillard, L., Mereau, A. and Osborne, H.B. (2006) Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions. *Biochimie*, **88**, 515–525.
48. Botta, A., Vallo, L., Rinaldi, F., Bonifazi, E., Amati, F., Biancolella, M., Gambardella, S., Mancinelli, E., Angelini, C., Meola, G. *et al.* (2007) Gene expression analysis in myotonic dystrophy: indications for a common molecular pathogenic pathway in DM1 and DM2. *Gene Expr.*, **13**, 339–351.
49. Osborne, R.J., Lin, X., Welle, S., Sobczak, K., O'Rourke, J.R., Swanson, M.S. and Thornton, C.A. (2009) Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 1471–1481.

50. 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.
51. Yadava, R.S., Frenzel-McCardell, C.D., Yu, Q., Srinivasan, V., Tucker, A.L., Puymirat, J., Thornton, C.A., Prall, O.W., Harvey, R.P. and Mahadevan, M.S. (2008) RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2–5 expression. *Nat. Genet.*, **40**, 61–68.
52. 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.
53. Junghans, R.P. (2009) Dystrophia myotonica: why focus on foci? *Eur. J. Hum. Genet.*, **17**, 543–553.
54. van Rooij, E., Liu, N. and Olson, E.N. (2008) MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet.*, **24**, 159–166.
55. Latronico, M.V. and Condorelli, G. (2009) MicroRNAs and cardiac pathology. *Nat. Rev. Cardiol.*, **6**, 419–429.
56. Perbellini, R., Greco, S., Sarra-Ferraris, G., Cardani, R., Capogrossi, M.C., Meola, G. and Martelli, F. (2011) Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul. Disord.*, **21**, 81–88.
57. Gambardella, S., Rinaldi, F., Lepore, S.M., Viola, A., Loro, E., Angelini, C., Vergani, L., Novelli, G. and Botta, A. (2010) Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients. *J. Transl. Med.*, **8**, 48.
58. Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C., Villemin, 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**, 840–845.
59. Johnson, R., Zuccato, C., Belyaev, N.D., Guest, D.J., Cattaneo, E. and Buckley, N.J. (2008) A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.*, **29**, 438–445.
60. Lee, Y., Samaco, R.C., Gatchel, J.R., Thaller, C., Orr, H.T. and Zoghbi, H.Y. (2008) miR-19, miR-101 and miR-130 co-regulate ATXN1 levels to potentially modulate SCA1 pathogenesis. *Nat. Neurosci.*, **11**, 1137–1139.
61. Krol, J., Fiszler, A., Mykowska, A., Sobczak, K., de Mezer, M. and Krzyzosiak, W.J. (2007) Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets. *Mol. Cell*, **25**, 575–586.
62. Yu, Z., Teng, X. and Bonini, N.M. (2011) Triplet repeat-derived siRNAs enhance RNA-mediated toxicity in a *Drosophila* model for myotonic dystrophy. *PLoS Genet.*, **7**, e1001340.
63. Timchenko, N.A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z.J., Quan, L. and Timchenko, L.T. (2004) Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 13129–13139.
64. Huichalaf, C., Sakai, K., Jin, B., Jones, K., Wang, G.L., Schoser, B., Schneider-Gold, C., Sarkar, P., Pereira-Smith, O.M., Timchenko, N. *et al.* (2010) Expansion of CUG RNA repeats causes stress and inhibition of translation in myotonic dystrophy I (DM1) cells. *FASEB J.*, **24**, 3706–3719.
65. Vignaud, A., Ferry, A., Huguet, A., Baraibar, M., Trollet, C., Hyzewicz, J., Butler-Browne, G., Puymirat, J., Gourdon, G. and Furling, D. (2010) Progressive skeletal muscle weakness in transgenic mice expressing CTG expansions is associated with the activation of the ubiquitin-proteasome pathway. *Neuromuscul. Disord.*, **20**, 319–325.
66. Onishi, H., Kino, Y., Morita, T., Futai, E., Sasagawa, N. and Ishiura, S. (2008) MBNL1 associates with YB-1 in cytoplasmic stress granules. *J. Neurosci. Res.*, **86**, 1994–2002.
67. Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C.A., Wattez, A., Vermersch, P. and Delacourte, A. (2001) Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 2143–2155.
68. Vermersch, P., Sergeant, N., Ruchoux, M.M., Hofmann-Radvanyi, H., Wattez, A., Petit, H., Dwailly, P. and Delacourte, A. (1996) Specific tau variants in the brains of patients with myotonic dystrophy. *Neurology*, **47**, 711–717.
69. Velazquez-Bernardino, P., Garcia-Sierra, F., Hernandez-Hernandez, O., Bermudez de Leon, M., Gourdon, G., Gomes-Pereira, M. and Cisneros, B. (2011) Myotonic dystrophy type 1-associated CTG repeats disturb the expression and subcellular distribution of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP2, and MAP6/STOP in PC12 cells. *Mol. Biol. Rep.*, doi: 10.1007/s11033-011-0753-y. Epub ahead of print 13 May 2011.
70. Andrade, A., de Leon, M.B., Hernandez-Hernandez, O., Cisneros, B. and Felix, R. (2007) Myotonic dystrophy CTG repeat expansion alters Ca<sup>2+</sup> channel functional expression in PC12 cells. *FEBS Lett.*, **581**, 4430–4438.
71. Quintero-Mora, M.L., Depardon, F., Waring, J., Robert, G.K. and Cisneros, B. (2002) Expanded CTG repeats inhibit neuronal differentiation of the PC12 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **295**, 289–294.
72. Marteyn, A., Maury, Y., Gauthier, M.M., Lecuyer, C., Vernet, R., Denis, J.A., Pietu, G., Peschanski, M. and Martinat, C. (2011) Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy. *Cell Stem Cell*, **8**, 434–444.
73. Meola, G. and Sansone, V. (2007) Cerebral involvement in myotonic dystrophies. *Muscle Nerve*, **36**, 294–306.
74. Weber, Y.G., Roebeling, R., Kassubek, J., Hoffmann, S., Rosenbohm, A., Wolf, M., Steinbach, P., Jurkat-Rott, K., Walter, H., Reske, S.N. *et al.* (2010) Comparative analysis of brain structure, metabolism, and cognition in myotonic dystrophy 1 and 2. *Neurology*, **74**, 1108–1117.
75. Wozniak, J.R., Mueller, B.A., Ward, E.E., Lim, K.O. and Day, J.W. (2011) White matter abnormalities and neurocognitive correlates in children and adolescents with myotonic dystrophy type 1: a diffusion tensor imaging study. *Neuromuscul. Disord.*, **21**, 89–96.
76. Romeo, V., Pegoraro, E., Squarzanti, F., Soraru, G., Ferrati, C., Ermani, M., Zucchetta, P., Chierichetti, F. and Angelini, C. (2010) Retrospective study on PET-SPECT imaging in a large cohort of myotonic dystrophy type 1 patients. *Neurol. Sci.*, **31**, 757–763.
77. Fugier, C., Klein, A.F., Hammer, C., Vassilopoulos, S., Ivarsson, Y., Toussaint, A., Tosch, V., Vignaud, A., Ferry, A., Messaddeq, N. *et al.* (2011) Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat. Med.*, **17**, 720–725.
78. Gomes-Pereira, M., Foiry, L., Nicole, A., Huguet, A., Junien, C., Munnich, A. and Gourdon, G. (2007) CTG trinucleotide repeat 'big jumps': large expansions, small mice. *PLoS Genet.*, **3**, e52.
79. Pelletier, R., Hamel, F., Beaulieu, D., Patry, L., Haineault, C., Tarnopolsky, M., Schoser, B. and Puymirat, J. (2009) Absence of a differentiation defect in muscle satellite cells from DM2 patients. *Neurobiol. Dis.*, **36**, 181–190.
80. Mulders, S.A., van Engelen, B.G., Wieringa, B. and Wansink, D.G. (2010) Molecular therapy in myotonic dystrophy: focus on RNA gain-of-function. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, R90–R97.
81. Timchenko, N.A., Cai, Z.J., Welm, A.L., Reddy, S., Ashizawa, T. and Timchenko, L.T. (2001) RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J. Biol. Chem.*, **276**, 7820–7826.
82. 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.
83. Jin, P., Duan, R., Qurashi, A., Qin, Y., Tian, D., Rosser, T.C., Liu, H., Feng, Y. and Warren, S.T. (2007) Pur alpha binds to rCGG repeats and modulates repeat-mediated neurodegeneration in a *Drosophila* model of fragile X tremor/ataxia syndrome. *Neuron*, **55**, 556–564.
84. Moore, K.J., Rayner, K.J., Suarez, Y. and Fernandez-Hernando, C. (2010) microRNAs and cholesterol metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.*, **21**, 699–706.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbadis](http://www.elsevier.com/locate/bbadis)

## Review

# RNA toxicity in human disease and animal models: From the uncovering of a new mechanism to the development of promising therapies<sup>☆</sup>

Géraldine Sicot, Mário Gomes-Pereira<sup>\*</sup>

Inserm U781, Hôpital Necker-Enfants Malades, 75015 Paris, France  
 Université Paris Descartes - Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Paris, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 4 December 2012  
 Received in revised form 1 March 2013  
 Accepted 4 March 2013  
 Available online xxxx

## Keywords:

Animal model  
 RNA toxicity  
 Trinucleotide repeat  
 Microsatellite expansion  
 Myotonic dystrophy  
 RNA splicing

## ABSTRACT

Mutant ribonucleic acid (RNA) molecules can be toxic to the cell, causing human disease through *trans*-acting dominant mechanisms. RNA toxicity was first described in myotonic dystrophy type 1, a multisystemic disorder caused by the abnormal expansion of a non-coding trinucleotide repeat sequence. The development of multiple and complementary animal models of disease has greatly contributed to clarifying the complex disease pathways mediated by toxic RNA molecules. RNA toxicity is not limited to myotonic dystrophy and spreads to an increasing number of human conditions, which share some unifying pathogenic events mediated by toxic RNA accumulation and disruption of RNA-binding proteins. The remarkable progress in the dissection of disease pathobiology resulted in the rational design of molecular therapies, which have been successfully tested in animal models. Toxic RNA diseases, and in particular myotonic dystrophy, clearly illustrate the critical contribution of animal models of disease in translational research: from gene mutation to disease mechanisms, and ultimately to therapy development. This article is part of a Special Issue entitled: Animal Models of Disease.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The abnormal expansion of trinucleotide repeat sequences was first identified as the cause of human diseases more than twenty years ago, in fragile-X syndrome [1–4] and spinobulbar muscular atrophy (SBMA) or Kennedy disease [5]. Over the two decades that followed, a fast growing number of human inherited diseases have been associated with the expansion of trinucleotide repeats at specific chromosomal loci, such as myotonic dystrophy type 1 (DM1), Huntington disease (HD), Friedreich ataxia (FRDA), dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA) and many spinocerebellar ataxias (SCAs) [6–8]. Typically, the number of triplet repeats in non-affected individuals is lower than 30, but it is higher than 40–50 in patients, and it may exceed 1000 repeats in the most severe clinical forms of certain diseases. Longer repeat tracts are genetically unstable and undergo further expansion during intergenerational transmission. Since the repeat size shows a broad direct correlation with disease severity, and inverse correlation with age of onset, expansion-biased intergenerational instability leads to anticipation (a hallmark of most dominant trinucleotide repeat disorders), whereby the disease symptoms worsen and develop earlier in successive generations. Trinucleotide repeat size mutations can also occur in somatic tissues, resulting in

the accumulation of tissue-specific, age-dependent, expansion-biased somatic mosaicism, which most likely contributes to the phenotypic variability and progression of disease over time [7,9,10].

Despite the similar genetic defect shared by these conditions, the downstream pathophysiology can be mediated by multiple pathways. This diversity in molecular pathogenesis is partially due to the different locations of the expanded repeat within a variety of otherwise unrelated genes. The expanded repeat tract can be located in protein-coding sequences, and therefore affect the final gene product of the mutant gene. This is the case in CAG expansion disorders (e.g.: HD, SBMA, DRPLA, SCA1, SCA2, SAC3/MJD, SCA7 and SCA17), whose molecular pathogenesis appears to be primarily mediated by a deleterious gain of function of the polyglutamine tract encoded by the expanded trinucleotide sequence [11]. Although not changing the final protein sequence, non-coding triplet repeats can also be pathogenic. Untranslated disease-associated repeat expansions can map in the 5' or 3' untranslated regions (UTRs), promoters or introns of the affected gene. In FRDA, the intronic GAA expansion interferes with transcription and reduces the mRNA and protein levels of the *FXN/frataxin* gene [12]. The expanded CGG repeat in fragile X syndrome, on the other hand, maps within the promoter of the *FMR1* gene, causing DNA methylation and promoter inactivation [13]. In both cases, disease pathogenesis is explained by loss of function of the expanded gene. Nonetheless, gain of function mechanisms, like those operating at the RNA level in DM1, can also be triggered by untranslated trinucleotide repeat expansions.

Soon after the identification of disease-associated trinucleotide repeat expansions, great effort was put into the generation of transgenic

<sup>☆</sup> This article is part of a Special Issue entitled: Animal Models of Disease.

<sup>\*</sup> Corresponding author. Inserm U781, Hôpital Necker-Enfants Malades, 75015 Paris, France. Tel.: +33 1 72 60 64 36; fax: +33 1 47 34 85 14.

E-mail address: [mario.pereira@inserm.fr](mailto:mario.pereira@inserm.fr) (M. Gomes-Pereira).



mouse lines, initially to investigate the mechanisms of trinucleotide repeat size mutation [14], but also to gain insight into the intricate sequence of molecular events that connect the expansion of simple DNA repeats to the development of complex disease symptoms. The contribution of animal models to the dissection of disease mechanisms is clearly illustrated in myotonic dystrophy, for which multiple mouse lines have been generated over the years. Following the identification of the CTG trinucleotide repeat as the genetic cause of DM1 in 1992 [15–17], the first transgenic mice recreating DM1-associated repeat instability were reported in 1997 [18,19]. Less than ten years following the identification of the DM1 mutation, transgenic mouse models provided solid evidence of a novel disease mechanism mediated by toxic RNA transcripts [20,21]. Transcription of non-coding DNA repeats produces expanded RNA transcripts that are deleterious to the cell, disturbing multiple downstream cellular processes and causing complex multisystemic disorders [22,23]. The generation of multiple and complementary disease animal models through the years (mainly mice, but also transgenic flies, fish and worms) resulted in the fine-tuning of the mechanisms of RNA toxicity, for which DM1 became the paradigm. Today we know that disease-causing RNA likely mediates the molecular pathogenesis of other conditions, most of them caused by the expansion of non-coding repeat sequences, such as DM type 2 (DM2) [24], fragile X tremor ataxia syndrome (FXTAS) [25], SCA type 8 (SCA 8) [26], SCA 10 [27], SCA 12 [28], SCA 31 [29], SCA 36 [30], Huntington disease-like 2 (HDL2) [31] and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [32]. Toxic RNAs have also been implicated in polyglutamine expansion disorders primarily mediated by proteotoxicity [33], suggesting that the contribution of RNA toxicity to disease might have wider implications than previously thought, and participate in multiple human conditions.

Recently, therapeutic strategies targeting specific steps of the pathobiological cascade were tested in DM1 animal models and yielded promising results [34–38]. The research path from the identification of disease mutation to the pre-clinical development of promising therapies took less than 20 years. During this period DM1 became not only a paradigm of RNA toxicity, but also a clear example of using animal models for the step-by-step dissection of complex mechanisms of human disease and rational therapy design. DM1 research has moved forward, from the clinic to the laboratory with the development of relevant disease models for academic research. The field is now returning to the clinic and human patients, offering the hope of efficient therapies. In this review, we will cover the contribution of animal models to this path. We will review the current understanding of RNA toxicity, focusing primarily on DM. We will discuss the current model of toxic RNA accumulation and missplicing, integrate recent findings into this model, review the latest progress in therapy development and discuss data that do not fit into the current working hypothesis.

## 2. A new disease intermediate: Non-coding expanded RNA repeats

DM is a highly multisystemic disorder, mainly characterised by myotonia, muscle weakness and wasting, cardiac conduction defects, neuropsychological manifestations, premature cataracts and insulin resistance [39]. Intergenerational instability and anticipation contribute to the phenotypic variability of the disease, resulting in different clinical forms, from a mild late onset, to the most severe congenital cases. Two clinically similar, but genetically distinct forms of the disease have been described: DM type 1 (DM1) and DM type 2 (DM2). DM1 is caused by the expansion of a non-coding CTG trinucleotide repeat in the 3'UTR of the *dystrophia myotonica protein kinase* (*DMPK*) gene [15–17], which overlaps with the promoter region of the downstream *sine oculis related homeobox 5* (*SIX5*) gene [40]. DM2 is caused by a CUG tetranucleotide repeat expansion in the first intron of the unrelated *CCHC-type zinc finger nucleic acid binding protein* (*CNBP*) gene, previously known as *zinc finger 9* (*ZNF9*) [24].

### 2.1. Early evidence of RNA toxicity in DM1 and DM2

The clinical and molecular similarities between DM1 and DM2 have helped uncover the role of expanded RNA repeats in DM pathogenesis. In both conditions, expanded RNA transcripts are retained in the nucleus, forming RNA aggregates (or foci) [24,41,42]. The accumulation of ribonucleic inclusions in DM1 and DM2 suggested abnormal gain of function mediated by expanded CUG RNA repeats in DM1, and CCUG RNA repeats in DM2. Today we know that RNA foci are dynamic protein-containing structures, which represent an important hallmark of toxic RNA disorders. The abnormal interaction between expanded RNA molecules and RNA-binding proteins contributes to cell dysfunction and disease phenotypes. In the search for proteins capable of mediating the deleterious effect of expanded RNAs in DM1, two families of splicing regulators were identified: MBNL (muscleblind-like) and CELF (CUGBP, Elav-like family) proteins. MBNL proteins bind double-stranded RNA hairpins [43]. All three mammalian protein isoforms (MBNL1, MBNL2 and MBNL3) are recruited to the nuclear RNA foci in DM1 and DM2 cells, presumably resulting in functional depletion [44]. CELF1 does not localise with RNA foci [45]. Instead this protein was identified through its capacity to bind CUG RNA repeats *in vitro* [46], and found to be upregulated in DM1 samples [47–50]. The situation is less clear in DM2, with conflicting reports of normal [51,52] and increasing CELF1 protein levels [53] in patient tissues and cells.

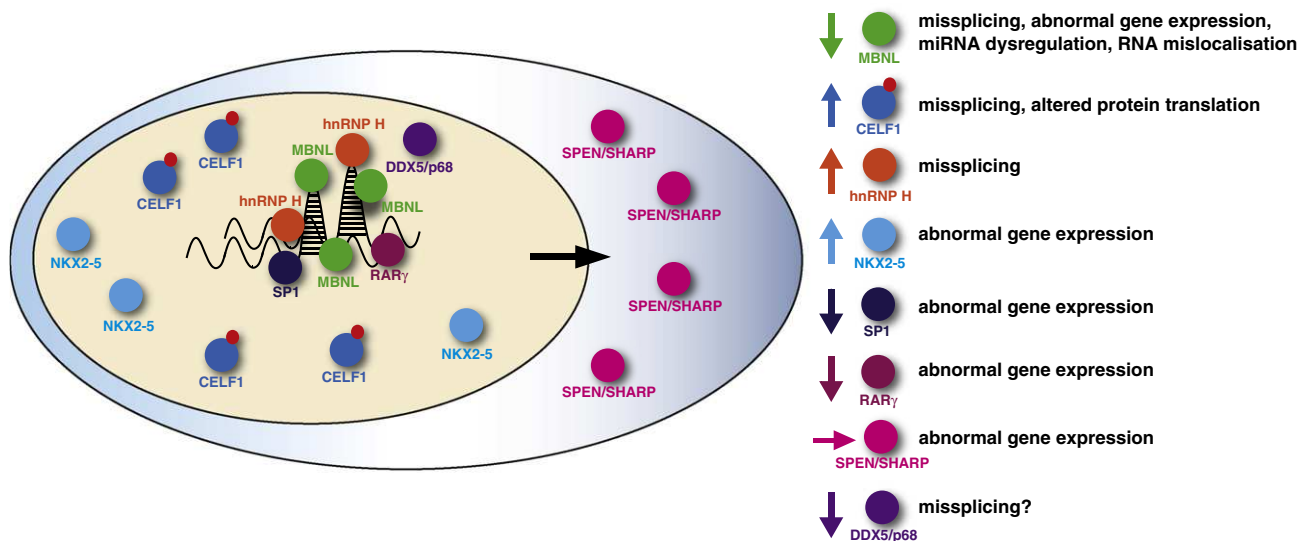
The abnormal localisation and/or protein levels of important splicing regulators, and the characterisation of splicing abnormalities in DM1 and DM2 [47–50,54] provided the first evidence of a unifying pathogenic mechanism mediated, at least partly, by aberrant RNA splicing (Fig. 1). Transgenic animal models generated definitive proof of RNA toxicity in DM, and demonstrated the central role of MBNL and CELF proteins in disease pathogenesis (Fig. 2).

### 2.2. Transgenic mouse models of RNA toxicity

The ultimate evidence of the *trans*-dominant role of toxic CUG RNA repeats came from transgenic mice engineered to express non-coding CUG repeats in an unrelated gene [21] (Table 1, Fig. 2). The *HSA*<sup>LR</sup> mice express human skeletal actin (*HSA*) transcripts containing ~250 CTG trinucleotide repeats within its 3'UTR. The expression of expanded *HSA* transcripts in the skeletal muscle resulted in DM1-like myotonic discharges at four weeks of age, and mild signs of myopathy at later stages [21]. The occurrence of myotonia in the absence of histological abnormalities suggests that *HSA*<sup>LR</sup> mice recreate a genuine myotonic disorder resulting from the accumulation of toxic RNA transcripts, rather than a non-specific hyperexcitability secondary to muscle necrosis. The positive correlation found between the expression levels of expanded *HSA*<sup>LR</sup> transcripts in different founder lines, and the degree of missplicing, myotonia and myopathy [21,55], further supported a dose-dependent effect of the levels of toxic CUG repeats on muscle physiology. The analysis of the cellular distribution of MBNL1 in response to the accumulation of CUG-containing transcripts revealed significant recruitment of this splicing regulator into ribonuclear foci, illustrated by a decrease to 20% of mean immunofluorescence intensity of MBNL1 in the nucleoplasm of *HSA*<sup>LR</sup> skeletal muscle (exclusive of nuclear foci), when compared to wild-type controls [21,51]. As a result of MBNL1 sequestration into nuclear foci, *HSA*<sup>LR</sup> mice showed deregulation of the alternative splicing of a set of transcripts in skeletal muscle [51,55]. The initial findings of normal steady-state CELF1 protein levels in *HSA*<sup>LR</sup> quadriceps [51] suggested that the sequestration of MBNL proteins was sufficient to trigger at least some key DM features in adult skeletal muscle. However, reports of CELF1 upregulation in *HSA*<sup>LR</sup> soleus [56] have challenged this hypothesis and supported the implication of CELF1 in muscle pathology.

This work has clearly demonstrated the deleterious consequences of CUG RNA repeats to skeletal muscle by inducing key features of the disease, such as myotonia, independently of the surrounding genomic





**Fig. 1.** Molecular pathogenesis of DM1. Expanded *DMPK* transcripts accumulate in the cell nucleus and are not appropriately exported to the cytoplasm. Toxic RNA accumulation affects the localisation and steady-state levels of multiple RNA-binding proteins, disturbing their function and having an impact on downstream targets. MBNL sequestration into RNA foci and functional inactivation dysregulates missplicing, gene expression and miRNA metabolism. Hyperphosphorylation-mediated CELF1 upregulation perturbs alternative splicing and protein translation. Increased hnRNP H levels may contribute to abnormal splicing. Transcription activation of NKX2-5 causes expression abnormalities of target genes. Similarly, sequestration of SP1 and RAR $\gamma$  transcription factors by expanded transcripts away from active chromatin likely disturbs gene expression. The cytoplasmic mislocalisation and subsequent inactivation of the transcriptional regulator SPEN/SHARP likely contributes to abnormal gene expression. Finally, the partial recruitment and co-localisation of DDX5/p68 with RNA foci may have a contributing role in the dysregulation of the splicing of a subset of RNA transcripts.

context. Nevertheless, the absence of pronounced muscle weakness or wasting in these mice suggests a role of the non-repetitive *DMPK* 3' UTR sequences flanking the CUG repeat. In addition, given the tissue-specificity of transgene expression in *HSA*<sup>LR</sup> mice, the plausible toxicity of RNA transcripts in other tissues remained to be demonstrated.

The multisystemic impact of CUG expansions was illustrated in DM300 transgenic mice expressing full-length expanded *DMPK* transcripts (bearing 300–600 CTG repeats) in multiple tissues, under the control of the human promoter (Table 1). Transgene expression in these mice resulted in the accumulation of ribonuclear foci in various tissues [20,57] and in the development of relevant muscle phenotypes (myotonia, myopathy, progressive muscle weakness), signs of tauopathy in the CNS similar to the human condition [20], as well as abnormal glucose metabolism [57], growth retardation and marked mortality [20]. The physiological, histological and molecular phenotypes were observed in homozygous mice and were more pronounced in mice carrying larger CTG expansions. These observations show that the expression levels of toxic RNA molecules and the length of the CTG repeat are determinant factors for the development of disease phenotypes. DMSXL mice (carrying ~1000–1800 CTG repeats in the same integration site) exhibit higher mortality, more severe reduction in body weight and splicing dysregulation [58,59], as well as deficits in motor performance [59], behavioural abnormalities and synaptic dysfunction [60]. No abnormalities were found in the control DM20 line, expressing short *DMPK* transcripts with 20 CTG repeats.

Further evidence of the pathogenic role of expanded RNAs was provided by an inducible Cre-lox mouse model, engineered to express 960 interrupted and untranslated CTG repeats within *DMPK* exon 15 (Table 1). Transgene expression in the heart of EpA960 mice resulted in severe cardiomyopathy, including cardiac arrhythmia leading to death within two weeks [61]. Transgene expression in skeletal muscle has also resulted in characteristic DM phenotypes, such as myotonic discharges, progressive muscle wasting, deficits in muscle performance and histopathological abnormalities [62]. The physiological phenotypes in cardiac and skeletal muscles of EpA960 mice were accompanied by nuclear RNA foci accumulation, MBNL1 sequestration, CELF1 and CELF2 upregulation and splicing defects [61,62].

Taken together, these mouse models have unequivocally demonstrated the central role of toxic RNA repeats in DM pathogenesis, and suggested a unifying disease mechanism mediated by the essential nuclear localisation and accumulation of expanded transcripts for pathogenesis (Fig. 2). Even though cytoplasmic RNA foci have been reported in DM1 fibroblasts and myoblasts [63], as well as in CUG- or CCUG-transfected cells [64,65], transgenic mice that accumulate CUG-containing ribonuclear foci predominantly in the cytoplasm do not recreate characteristic DM phenotypes [63]. The physiological impact of cytoplasmic RNA foci is not fully understood.

Depending on the temporal and spatial control of transgene expression, each of these mouse lines exhibits advantages and limitations [66]. In reality, they complement each other towards a greater understanding of disease biology and the development of rational therapies. Despite the prevalent contribution of mouse lines in deciphering RNA toxicity, toxic RNA mechanisms have also been reproduced and investigated in other model organisms.

### 2.3. Other animal models of RNA toxicity

The processes underlying the formation of CUG-containing foci are conserved in *Drosophila*. Flies expressing 162 CTG repeats in the 3' UTR of a *GFP* reporter gene showed nuclear foci that co-localise with muscleblind [67]. Despite ubiquitous transgene expression, only a subset of adult muscle cells showed RNA foci, indicating that cell type-specific factors must mediate the retention of CUG-containing transcripts in the nucleus. Surprisingly, no deleterious phenotype was detected in these flies, suggesting that neither (CUG)<sub>162</sub> repeat expansions in this genomic context, nor the accumulation of RNA foci is toxic to *Drosophila per se* [67]. In contrast, the expression of non-coding CTG sequences longer than 250 repeats caused muscle, eye and brain phenotypes in association with RNA foci, muscleblind sequestration [68] and missplicing [69]. The pathological phenotypes of these lines might be explained by a length-dependent effect, or by the contributing role of the genomic context surrounding the CUG repeat. In fact, independent *Drosophila* lines expressing non-coding CTG expansions in different integration sites displayed

**CUG-expressing mice**

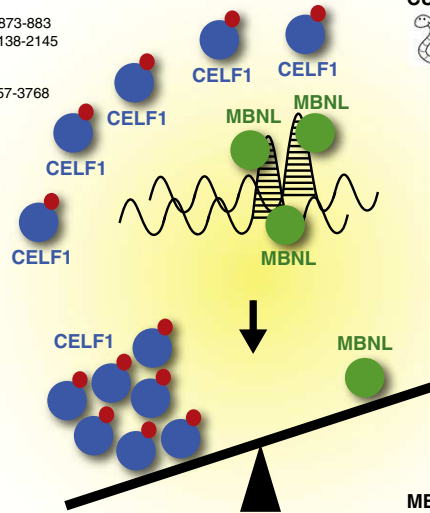
- \* Mankodi et al. *Science* 289 (2000) 1769-1773 (muscle-specific)
- \* Seznec et al. *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 2717-2726 (multisystemic)
- \* Wang et al. *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 2802-2811 (inducible)
- \* Mahadevan et al. *Nat. Genet.* 38 (2006) 1066-1070 (reversible)

**CUG-expressing flies**

- \* Houseley et al. *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 873-883
- \* de Haro et al. *Hum. Mol. Genet.* 15 (2007) 2138-2145
- \* Le Mée et al. *PLoS One* 3 (2008) e1466
- \* Yu et al. *PLoS Genet.* 7 (2011) e1001340
- \* Lawlor et al. *Hum. Mol. Genet.* 20 (2011) 3757-3768

**CUG-expressing *Caenorhabditis elegans***

- \* Wang et al. *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011) 1255-1267
- \* Chen et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352 (2007) 774-779

**CELF1-overexpressing mice**

- \* Timchenko et al. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 13129-13139 (constitutive in muscle)
- \* Hao et al. *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 1539-1547 (constitutive in muscle and heart)
- \* Koshelev et al. *Hum. Mol. Genet.* 19 (2010) 1066-7105 (inducible)

**MBNL-deficient mice**

- \* Kanadia et al. *Science* 302 (2003) 1978-1980 (*Mbnl1* knock-out)
- \* Lin et al. *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 2087-2097 (*Mbnl2* knock-out)
- \* Hao et al. *Dev. Dyn.* 237 (2008) 403-410 (*Mbnl2* knock-out)
- \* Charizanis et al. *Neuron* 75 (2012) 437-450 (*Mbnl2* knock-out)

**muscleblind-deficient flies**

- \* Artero et al. *Dev. Biol.* 195 (1998) 131-143
- \* Machuca-Tzili et al. *Hum. Genet.* 120 (2006) 487-499

**MBNL1-deficient *Caenorhabditis elegans***

- \* Wang et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366 (2008) 705-709
- \* Spilker et al. *Neural. Dev.* 7 (2012) 7

**MBNL2-deficient Zebrafish**

- \* Machuca-Tzili et al. *Dis. Model. Mech.* 4 (2011) 381-392

**Fig. 2.** The contribution of some transgenic animals to the understanding of the fundamental pathways of RNA toxicity in DM. Transgenic mice, *Drosophila* and *C. elegans* have been engineered to express non-coding trinucleotide CUG repeats, directly demonstrating the toxicity of expanded RNA transcripts across a variety of tissues and species. Additional animal models were generated through inactivation of MBNL proteins or the upregulation of CELF1, to show the important contribution of these two splicing regulators in the mechanisms that govern RNA toxicity and disease pathogenesis.

RNA foci accumulation, but only one low-expressing line exhibited an eye degenerative phenotype [70].

The toxicity of CUG repeats has been shown to extend to other model organisms. The expression of untranslated CUG expansions in the body wall muscles of the nematode *Caenorhabditis elegans* caused severe developmental defects in a length-dependent manner, possibly recreating aspects of the congenital form of DM1 [71].

In summary, CUG repeats are toxic to a variety of model organisms (Fig. 2) indicating common mechanisms of RNA toxicity with harmful effects to the cell (Table 1).

#### 2.4. Considerations on animal models of RNA toxicity

The value of a transgenic animal model of human disease relies on its ability to recreate molecular and phenotypic aspects of the disorder as faithfully as possible. The generation of relevant animal models demands careful thought and planning. Our past experience with DM animal models has highlighted several aspects that must be considered, guiding us through some of the choices when creating a mouse model of toxic RNA. *Firstly*, the type of model: classic transgenic versus a conditional/inducible line. In contrast to conventional transgenic models, conditional or inducible models allow spatial and temporal control of transgene expression. The inducible EpA960 [61,62] illustrates the advantage to dissect tissue-specific disease mechanisms, over the

conventional, multisystemic DM300/DMSXL mice [20]. *Secondly*, transgenic lines generated by random integration of different constructs (e.g. different repeat lengths) must be carefully matched for transgene copy number and expression levels to obtain comparable lines. *Thirdly*, the choice of promoter to drive the expression of the transgene should faithfully recapitulate the native expression pattern. This could be achieved through the engineering of knock-in mice or the use of BAC or YAC constructs that include the human promoter and regulatory regions. Cell-specific promoters may also be considered to determine the impact on the mutation in specific cell populations, like in *HSA<sup>LR</sup>* mice that specifically express untranslated CUG repeats in skeletal muscle [21]. *Fourthly*, the purity of the repeat must be considered, as interruptions can modify the disease phenotype in humans [72,73] and in transgenic animals [74]. *Fifthly*, the choice of genetic background has a profound impact on the phenotypic expression of a genetic mutation. The neuropsychological phenotypes, in particular, are dramatically responsive to genetic background.

The introduction of large repeats into transgenic animals is sometimes required, either to induce severe phenotypes or to study the mechanisms of repeat instability that generate large expansions. This adds an additional difficulty, since pure large repeats tend to be dramatically unstable during the cloning steps into bacteria, with a marked tendency to contract [75]. There are several ways around this problem. The insertion of large genomic transgenes into BACs

or YACs can protect the expanded repeat from the predominant contraction events in bacteria and yeast. This strategy was successfully used to generate the DM300 mice [76]. Interruptions can also stabilise the repeat and avoid repeat loss during bacterial cloning, like in EpA960 mice [61]. Alternatively, bacteria strains and growth conditions can be optimised to minimise repeat contractions and increase the rate of expansion [77]. Finally, artificially long repeats can be created by PCR to bypass the risk of repeat loss during bacterial amplification [78].

### 3. Refining our understanding of RNA toxicity: Putting together the pieces of the puzzle

Despite indirect evidence of MBNL and CELF involvement in a disease mechanism characterised by nuclear RNA retention and splicing dysregulation, the direct role of these two protein families in disease pathogenesis remained to be demonstrated. The generation of transgenic mice inactivated for MBNL1 or MBNL2 proteins, or overexpressing CELF1 has resolved this question (Fig. 2).

#### 3.1. Inactivation of MBNL proteins

In order to test the hypothesis that sequestration of MBNL1 by RNA foci contributes to DM1 pathogenesis, the murine *Mbnl1* gene was genetically inactivated (Table 1). *Mbnl1*<sup>Δ3/Δ3</sup> mice were engineered to express *Mbnl1* isoforms unable to bind the CUG RNA repeats, thereby recreating the DM1 situation, where CUG-binding isoforms are extensively sequestered into ribonuclear foci and become functionally unavailable. *Mbnl1*<sup>Δ3/Δ3</sup> mice show typical DM1-associated features, such as myotonia, dust-like cataracts [79], cardiac-conduction defects [80], and lack of motivation and apathy in behavioural tasks [81]. These phenotypes were associated with extensive spliceopathy in mouse skeletal muscle and heart [79], as well as brain, to a milder extent [80]. The disruption of the *muscleblind* homolog in flies is lethal and induces muscle defects [82], associated with splicing abnormalities [83]. In *C. elegans*, *CeMbl* mutation causes neuromuscular junction impairment, decreases synaptic density and is associated with behaviour abnormalities [84]. These findings are consistent with a pathogenic role of MBNL1 sequestration and loss of function in multiple tissues. Nevertheless, *Mbnl1* inactivation does not reproduce all disease features and experimental evidence has suggested that additional proteins of the muscleblind family play a role in the molecular mechanisms of disease pathogenesis. In addition to MBNL1, MBNL2 and MBNL3 also colocalise with expanded *DMPK* and *CNBP* ribonuclear inclusions [44], and possibly mediate key events in the disease cascade. Additionally, MBNL1 loss of function in *Mbnl1*<sup>Δ3/Δ3</sup> mice does not explain all the gene expression changes detected in the *HSA*<sup>LR</sup> line [85], suggesting the role of additional disease intermediates. Therefore, a combinatorial loss of function of several muscleblind-like proteins may contribute to the disease process.

To address the involvement of MBNL2, the other major MBNL protein expressed in adult tissues, knock-out mouse and zebrafish lines were generated (Fig. 2). One of the mouse lines exhibited a normal muscle phenotype [51], while a second line displayed motor and muscle phenotypes, which included myotonic discharges, histological abnormalities and mild missplicing in skeletal muscle [86]. The milder phenotype of these mice, when compared to the *Mbnl1*<sup>Δ3/Δ3</sup> knock-out line, argued against a major role of MBNL2 loss of function in muscle pathology. In contrast, the prominent role of MBNL2 inactivation in the CNS was recently illustrated in a third *Mbnl2*-deficient line. These mice showed splicing abnormalities, specifically in the CNS, in contrast to the modest brain missplicing in *Mbnl1* knock-out. In addition, *Mbnl2*-deficient mice displayed relevant sleep disturbances, cognitive deficits and impaired synaptic transmission [87]. These data support a tissue-specific component of the contribution of MBNL loss-of-function to disease phenotypes: while MBNL1 is a prevalent splicing factor and disease

intermediate in skeletal muscle, MBNL2 plays a predominant role in the CNS. The determinant role of MBNL2 has been corroborated by the developmental abnormalities detected in zebrafish following *mbnl2* inactivation [88] (Table 1).

The involvement of MBNL3 in DM is less clear, and no animal models have been generated to address this question. MBNL3 is mainly expressed in embryonic tissues [89], and although upregulation of this protein was detected in DM1 skeletal muscle [90], its contribution to pathogenesis has not been determined.

#### 3.2. CELF1 overexpression

The inactivation of MBNL proteins fails to recreate important DM phenotypes, such as muscle weakness, suggesting a role for additional disease intermediates. To investigate the contribution of CELF1 upregulation to disease pathogenesis, overexpressing mice were generated (Fig. 2). The constitutive overexpression of CELF1, either ubiquitously or in muscle, resulted in severe developmentally phenotypes, possibly mimicking certain aspects of the congenital form of DM1 [91,92]. To overcome the high mortality of these lines and to investigate the tissue-specific consequences of CELF1 upregulation, an inducible CELF1-overexpressing line was generated. Tissue-specific CELF1 overexpression in either skeletal muscle or heart of adult mice induced DM1-characteristic phenotypes and was associated with the missplicing of CELF1-dependent target transcripts [93,94], indicating that CELF1 upregulation is sufficient to reproduce some features of DM-associated RNA toxicity (missplicing) and physiological phenotypes (myopathy and cardiomyopathy) (Table 1).

CELF2 upregulation has been reported in DM1 human brains [60,95] and associated with missplicing of MAPT/Tau [95]. Further studies are required to determine the implications of this finding to the neuropsychological manifestations of DM1.

#### 3.3. Dysregulation of a developmental programme of alternative splicing induces DM relevant disease features

The generation of transgenic mouse models expressing altered levels of MBNL and CELF proteins, demonstrated the central role of these two antagonistic families of splicing regulators in DM molecular pathogenesis. Proper splicing of MBNL- and CELF-dependent transcripts depends on a fine equilibrium between these two splicing regulators. MBNL1 intracellular distribution and CELF1 steady-state levels are developmentally regulated in mouse. While MBNL1 translocates from a predominantly cytoplasmic location in the embryo to a predominantly nucleoplasmic location in adult animals [51], CELF1 steady-state levels decrease in adult heart and skeletal muscles when compared to newborn tissues [96,97]. The expression of toxic CUG RNA repeats affects these two families of splicing regulators through the sequestration of MBNL proteins in the nucleus [43,44], and PKC-mediated hyperphosphorylation of CELF1 and subsequent protein stabilisation and upregulation [96]. The MBNL1 recruitment to nuclear foci and the increased levels of CELF1 mimic the embryonic situation, resulting in aberrant expression of embryonic splicing profiles in adult skeletal muscle and heart. However, direct evidence to demonstrate that missplicing is causative of disease, rather than a downstream epiphenomenon parallel to the pathogenic pathway was lacking. The pathogenic role of missplicing in DM1 was tested directly by the manipulation of the *HSA*<sup>LR</sup> mouse model expressing non-coding CUG repeats in the skeletal muscle. Chloride channel *Cln1* transcripts undergo many splicing abnormalities in the skeletal muscle of adult *HSA*<sup>LR</sup> mice, such as the retention of embryonic exon 7a [21,48,55]. Misspliced *Cln1* transcripts can either undergo accelerated non-sense mediated decay or encode truncated non-functional chloride channels, resulting in decreased CLCN1 immunostaining in the sarcolemma [55] and dramatic 70% reduction in transmembrane CLCN1 channel currents in isolated muscle fibres [98,99]. The injection and electroporation of a morpholino antisense oligonucleotide into the tibialis anterior muscle of *HSA*<sup>LR</sup> mice reversed *Cln1* missplicing, upregulated sarcolemmal expression,

**Table 1**  
Main animal models of toxic RNA diseases, their genetic features, phenotypes and implications to the understanding of disease biology.

Disease	Strategy	Animal model		Main phenotypes	Main molecular features	Implications	References
		Species	Genetic features				
DM1	CUG expressing lines	Mouse	Expression of untranslated CTG expansion in skeletal muscle	Myotonia and mild myopathy	RNA foci; MBNL sequestration; missplicing	Non-coding CUG repeats are toxic in muscle, independent of genomic context	[21]
			Multisystemic expression of expanded human DMPK transcripts	Mild myotonia; progressive muscle weakness; abnormal glucose metabolism; tauopathy; synaptic dysfunction	RNA foci; MBNL sequestration; mild missplicing	Non-coding CUG repeats are deleterious to multiple tissue and organ systems	[20,57–60]
			Inducible expression of untranslated CTG expansions within <i>DMPK</i> exon 15	Myotonia; progressive muscle wasting; cardiac conduction defects; histopathology	RNA foci; MBNL sequestration; CELF1 upregulation; missplicing	Tissue-specific toxicity of CUG repeats in skeletal muscle and heart	[61,62]
			Inducible and reversible overexpression of short CTG repeats	Myotonia; cardiac conduction defects	Histopathology; CELF1 upregulation; NKX2–5 upregulation	Reversibility of RNA toxicity and DM1 phenotypes	[178]
		<i>Drosophila</i>	Expression of untranslated (CTG) <sub>160</sub> expansions	No detectable pathological phenotype	RNA foci; MBNL sequestration	RNA foci are not sufficient to elicit pathology	[67]
			Expression of untranslated and interrupted (CTG) <sub>480</sub> expansions	Eye and muscle degeneration; muscle wasting	RNA foci; missplicing	MBNL1 and CELF1 mediate pathology in flies. Identification of chemical and genetic modifiers of CUG toxicity.	[68,121]
			Inducible expression of untranslated CTG expansions	Eye neurodegeneration; reduced viability	RNA foci	Role of genomic context in toxicity of CUG repeats	[70]
		<i>Caenorhabditis elegans</i>	Expression of untranslated CTG and CAG complementary expansions	Eye neurodegeneration	RNA foci; missplicing	Enhancement of CUG toxicity by siRNA pathways	[69]
			Expression of untranslated CTG repeat expansions	Eye neurodegeneration; movement disorder	miRNA dysregulation	Role of Dicer-mediated pathways in disease pathogenesis	[131]
			Expression of untranslated CAG and CTG expansions	High mortality; growth retardation; defective muscle development	Not reported	CUG RNA repeats are toxic in <i>C. elegans</i> and disturb development	[71]
<i>Mbnl1</i> KO	Mouse	Absence of CUG-binding MBNL isoforms	Shortened life span; reduced motility	RNA foci; MBNL sequestration	Toxicity of CUG and CAG RNA repeats in <i>C. elegans</i> is mediated by MBNL1	[198]	
		Disruption of <i>muscleblind</i>	Myotonia; cataracts; apathy and motivational deficits; histopathology	Missplicing	MBNL1 inactivation induces DM phenotypes	[79,81]	
		Disruption of <i>muscleblind</i>	Motility phenotypes; impaired neuromuscular junction	Not reported	Regulatory role of MBNL1 in synapse formation	[84]	
<i>Mbnl2</i> KO	Mouse	Disruption of the second intron of the mouse <i>Mbnl2</i> gene by insertion of Neo-LacZ gene trap	Muscle defects; lethality; histopathology	Missplicing	Role of <i>muscleblind</i> in muscle development and physiology	[82,83]	
		Disruption of the second intron of the mouse <i>Mbnl2</i> gene by insertion of Neo-LacZ gene trap	Myotonia; myopathy	Missplicing; histopathology	Controversial role of MBNL2 inactivation in DM muscle pathology.	[86]	
			Normal muscle phenotype	Normal phenotype			[51]

			Gene disruption by insertion of a retroviral GT vector in the fourth intron of the mouse <i>Mbnl2</i> gene				
		Zebrafish	Disruption of <i>Mbnl2</i> exon 2 by homologous recombination	Sleep abnormalities; cognitive deficits; seizure susceptibility	Missplicing in brain	MBNL2 loss of function induces phenotypes in CNS	[87]
			Disruption of <i>mbnl2</i> gene	Developmental abnormalities in eyes, heart, brain and muscle; histopathology.	Missplicing	Role of MBNL2 in pathology and development	[88]
	CELF1 overexpression	Mouse	Constitutive CELF1 overexpression in skeletal muscle	Impaired muscle development; high mortality	Histopathology	CELF1 upregulation causes developmental abnormalities (contribution to congenital DM1?)	[91]
			CELF1 overexpression in skeletal muscle and heart	Neonatal mortality; histopathology; impaired development	Missplicing		[92]
			Conditional CELF1 overexpression	Cardiac hypertrophy; cardiomyopathy; mouse lethality	Missplicing	CELF1 overexpression in skeletal and heart is sufficient to recreate some important disease phenotypes	[93,94]
FXTAS	CGG expressing lines	<i>Drosophila</i>	Expression of untranslated CGG expansions	Ubiquitous expression: lethal	Cytoplasmic and nuclear ubiquitin-positive inclusion; Pur $\alpha$ sequestration	CGG RNA repeats are toxic and mediate FXTAS pathogenesis. Identification of disease modifiers.	[140,144]
		Mouse	Expression of untranslated CGG expansions	Learning and motor deficits; histopathology	Intranuclear inclusions in brain		[141,143]
SCA8	CUG expressing lines	<i>Drosophila</i>	Expression of non-coding CUG <i>ATXN8</i> RNA	Eye neurodegeneration	Sequestration of Staufen	Non-coding CUG SCA8 repeats are toxic. Identification of disease modifiers.	[152]
	CAG and CUG expressing lines	Mouse	Expression of full-length human <i>ATXN8</i> transcripts (sense and antisense)	Neurological phenotype; histopathology	RNA foci; MBNL1 sequestration; missplicing; dysregulation of CELF1 targets	Role of polyglutamine stretches and toxic RNA and in SCA8	[26,153]
HDL2	CAG and CUG expressing lines	Mouse	Expression of both strands of an expanded <i>JPH3</i> gene	Motor deficits; neurodegeneration	RNA foci; MBNL1 and CBP sequestration; polyglutamine inclusions	Role of polyglutamine stretches and toxic RNA and in HDL2	[157]
SCA10	AUUCU RNA expressing lines	Mouse	Expression of an intronic ATTCT expansion in <i>ATXN10</i> gene	PKC $\delta$ accumulation in mitochondria	RNA foci; hnRNP K sequestration	Non-coding AUUCU repeats are toxic, independent of genomic context	[27]
		Mouse	Expression of a ATTCT expansion in 3'UTR of an unrelated gene	Locomotive dysfunction; seizures; neurodegeneration; PKC $\delta$ accumulation in mitochondria	RNA foci; hnRNP K sequestration		[161]
SCA12	Ppp2r2b overexpression	<i>Drosophila</i>	Overexpression of the B $\beta$ 2 isoform and <i>Drosophila</i> homolog	Shortened life span; neurodegeneration; autophagy	Increased oxidative stress	Non-coding intronic CAG repeats in B $\beta$ 2 isoform are toxic	[166]



normalised transmembrane *CLCN1* currents and eliminated myotonic discharges [100], providing direct evidence for the causative role of missplicing in myotonia development. More recently, muscle weakness in DM1 and DM2 was associated with bridging integrator 1 (*BIN1*) missplicing. *BIN1* is a lipid-binding protein that is involved in the biogenesis of the T tubule network in muscle and in the regulation of the excitation–contraction coupling. Inactivation of *MBNL1* by foci sequestration induces *BIN1* exon 11 skipping and deregulates the lipid-binding activity of *BIN1* and contributes to muscle weakness. The link was shown by an exon-skipping strategy designed to force the exclusion of exon 11 in the skeletal muscle of wild-type mice, which resulted in morphological changes and a decrease in specific muscle strength. Similar to the role of *CLCN1* and *BIN1* missplicing in causing myotonia and muscle weakness, respectively, the missplicing of the insulin receptor (*INSR*) most likely accounts for the DM-associated insulin resistance, since it produces an isoform with lower signalling capacity [49,50]. Other transcripts misspliced in heart (e.g. *TNNT2*) or in brain (e.g. *NMDA* receptor 1 or microtubule-associated Tau protein) may contribute to tissue-specific disease manifestations. However, direct evidence of a cause–effect relationship is still missing.

Importantly, dysregulated splicing can also be a secondary consequence of tissue degeneration. To illustrate the confounding effect of muscle regeneration, induced and genetic non-DM models of muscle injury shared missplicing events with established DM1 models, in association with changes in the expression of *MBNL* and *CELF* proteins [101]. These results suggest that splicing regulators respond not only to toxic CUG RNA repeats, but also to cycles of muscle damage and subsequent regeneration, to increase the expression of neonatal splicing isoforms. Although a primary consequence of RNA toxicity, dysregulation of alternative splicing in DM can also be a consequence of muscle regeneration.

#### 4. New insights into DM molecular pathogenesis and RNA toxicity

The working model of RNA toxicity has been recently challenged by experimental evidence that shows directly that molecular pathogenesis goes beyond spliceopathy.

##### 4.1. Two protein families, many consequences to the cell: altered RNA expression, metabolism and localisation

Microarray studies have revealed abnormal gene expression in muscle biopsies from DM1 and DM2 patients [102–104]. The comparative study of DM mouse models by expression microarrays revealed that 60–70% of these changes could be explained by loss of *MBNL1* [85,105]. Besides an important role in splicing regulation, *MBNL1* and *CELF1* can control gene expression, possibly operating at different levels (Fig. 1). Both *MBNL1* and *CELF1* can bind directly the 3'UTR of target transcripts to regulate mRNA decay [106]. In addition, *MBNL1* participates in the regulation of the biogenesis of miRNA species, having an impact on the expression of their targets [107]. As a result, *MBNL1* sequestration likely contributes, at least partly, to miRNA dysregulation in DM1 and DM2 muscle biopsies [107–110], as well as in CUG-expressing transgenic flies [111]. At the post-transcriptional level, *CELF1* increases the translation of some downstream transcripts [91,112].

*MBNL* proteins can also have a cytoplasmic role in mRNA localisation, as illustrated by the subcellular relocalisation of *MBNL* targets in myoblasts and flies depleted of *MBNL* proteins. These results predict an impact of DM and *MBNL* inactivation on cellular structures that are particularly sensitive to mRNA localisation (such as neuronal synapses or the neuromuscular junction) [113]. Previously, *MBNL2* was found to be required for the correct localisation of integrin  $\alpha 3$  protein to the adhesion complexes [114]. However, the relevance of these findings to DM pathogenesis remains to be explored.

In any case, any deviation from the fine balance between the *MBNL* and *CELF* protein families will affect, not only the alternative

splicing of target transcripts but also gene expression, protein levels, as well as RNA and protein localisation (Fig. 1).

##### 4.2. *MBNL* and *CELF* joined by other partners in crime

DM molecular pathogenesis is not limited to the dysregulation of *MBNL* and *CELF* proteins and is most likely mediated by additional disease intermediates, as illustrated by evidence mostly gathered from DM cell models (Fig. 1). *Firstly*, hnRNP H levels are elevated in DM1 myoblasts, possibly contributing to abnormal splicing [115]. *Secondly*, the aberrant cytoplasmic localisation of *SPEN* homolog, transcriptional regulator (*SPEN/SHARP*) in DM1 cells functionally inactivates this transcription factor and can explain the downregulation of transcripts, independently of *MBNL1* inactivation or *CELF1* upregulation [116]. *Thirdly*, the RNA DEAD box helicase 5 (*DDX5/p68*) partially localises with RNA foci in transfected cells, and shows a modest effect on the regulation of the splicing events affected in DM1 [117]. *Fourthly*, expanded RNAs bind and sequester *SP1* and retinoic acid receptor  $\gamma$  (*RAR $\gamma$* ) in DM1 cells, affecting gene expression through the redistribution and depletion of these transcription factors from active chromatin [118]. *Fifthly*, *NK* homoeobox 5 (*NKX2-5*) is transcriptionally activated in DM1, contributing to changes in gene expression in skeletal and cardiac muscles [119].

Transgenic flies have also been particularly useful in the identification of cellular components altered by the CTG expansion, as well as genetic modifiers of CUG toxicity, helping to expand our understanding of an increasing number of disease intermediates in DM pathogenesis [120,121].

Mimicking the abnormal expression and/or mislocalisation of these proteins in animal models is required to decipher the underlying mechanisms and the impact of these changes in various tissues, their implications to disease manifestations and their therapeutic potential.

##### 4.3. Shuffling the cards: RNA toxicity and polyglutamine toxicity are not mutually exclusive

Following the discovery of the pervasive transcription, a CAG-containing *DMPK* antisense transcript was identified emanating from the DM1 locus [122]. Bidirectional transcription across repeat expansions is a recurrent feature in some trinucleotide repeat loci [123], and results in the production of multiple toxic repeat-containing transcripts, and in a significantly higher pathogenic potential of microsatellite expansions. The role of antisense *DMPK* transcripts in disease pathogenesis is still unclear. It was initially suggested that antisense RNA acts as a *trans*-modifier of chromatin environment and gene expression, through the generation of 21-nucleotide fragments [122]. Insulator *CTCF* binding sites were identified flanking the CTG repeat in the DM1 locus, possibly regulating chromatin insulation and transcription [124]. Large congenital CTG repeat expansions were associated with loss of *CTCF* binding, spreading of the region of antisense transcription, histone modifications, heterochromatinisation and CpG methylation [122]. Such modifications may lead to the loss of insulator activity and high *DMPK* expression levels in late embryogenesis, when *SIX5* expression is also high. The subsequent accumulation of abnormally increased levels of *DMPK* transcripts may contribute to the earlier and severe congenital phenotype. Identification of antisense transcripts and *CTCF* binding sites flanking trinucleotide repeats at other disease loci suggests that certain epigenetic features and chromatin regulatory pathways described at the DM1 locus might be shared with other repeat sequences in the genome [123,125,126]. The importance of epigenetic regulation at repeat loci transcribed in both directions was illustrated through the generation of transgenic mice of *SCA7*, a dominant neurodegenerative disorder caused by the expansion of a polyglutamine-encoding CAG trinucleotide expansion. The mutation of the *CTCF* binding sites flanking the repeat resulted in loss of antisense transcription, and concomitant *cis* derepression of an alternative sense transcript, in association with

histone modifications and chromatin remodelling [127]. These results highlight the important of epigenetic regulation in the control of gene expression and disease pathology associated with repeat loci bidirectionally transcribed.

Today, we know that antisense *DMPK* transcripts accumulate in CAG-containing RNA foci in DM1 tissues and in DMSXL transgenic mice [59], possibly triggering additional pathways of toxicity. This hypothesis is corroborated by the muscle histopathology and behavioural phenotypes developed by mice expressing untranslated CAG repeats in an unrelated context [128]. The absence of polyglutamine tracts in these models clearly implicates a component of RNA toxicity in CAG expansion disorders, previously considered as exclusively mediated by proteotoxicity. The co-localisation of MBNL1 with CAG-containing foci in transfected cells [129], in mice expressing non-coding CAG repeats [128] and in DM1 human tissues [59], predicts a unifying mechanisms for CUG and CAG RNA toxicity grounded on MBNL1 sequestration and loss of function. In support of this view, the splicing of MBNL1-dependent targets is dysregulated in HD and SCA3 fibroblasts [130], extending the impact of spliceopathy to CAG repeat expansion diseases.

Interestingly, the co-expression of untranslated CUG and CAG RNA repeats has a synergistic effect and aggravates the phenotypes of flies expressing one single type of repeats [69,131,132]. The enhanced toxicity is mediated by the small interference RNA (siRNA) machinery, which generates 21-nucleotide fragments that target and reduce the levels of other repeat-containing target transcripts in the cell [69,131]. Repeat containing siRNA species can also be generated by the cleavage of single-stranded CUG- and CAG-containing transcripts folded into imperfect hairpins [133,134]. The expression of sense and antisense *DMPK* transcripts in DM1 cells may therefore activate siRNA biogenesis through similar mechanisms, generating repeat-containing siRNA that will contribute to gene expression dysregulation. The siRNA targets as well as their distribution and contribution to DM pathogenesis can be studied in transgenic mice expressing expanded repeat-containing transcripts.

These findings have extended the role of RNA toxicity to other diseases. However, given the overwhelming evidence of the deleterious effect of polyglutamine peptides [11], it remains unclear whether CAG RNA toxicity contributes significantly to the pathogenesis of polyglutamine expansion disorders.

## 5. Pushing the boundaries of RNA toxicity: Other toxic RNA diseases

Although setting the paradigm of toxic RNA diseases, DM is no longer alone – evidence of RNA toxicity has been found in other human conditions. Transgenic animal models have provided crucial evidence of toxic RNA mechanisms in these disorders, and revealed similarities as well as differences with the mechanisms operating in DM (Table 1, Fig. 3).

### 5.1. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)

Fragile X syndrome is the most common inherited form of mental retardation, and it has been associated with a CGG repeat expansion in the 5'UTR of the *fragile X mental retardation 1 (FMR1)* gene. While the non-affected population has up to 55 repeats, fragile X patients carry more than 200 CGG repeats [1,4,135]. Elderly individuals carrying premutations of 55–200 CGG develop a progressive neurodegenerative disorder called fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS), mainly characterised by cerebellar gait ataxia and intention tremor, among other neurological symptoms [136]. Although caused by mutations in the same locus, fragile X syndrome and FXTAS are mediated by distinct disease mechanisms: *FMR1* loss of function in fragile X syndrome, and toxic RNA gain of function in FXTAS.

The first evidence that FXTAS is mediated by toxic CGG RNA repeats came from the observation that *FMR1* mRNA levels are

increased in individuals carrying 55–200 CGG repeats [137], and from the accumulation of expanded CGG-containing mRNA transcripts in intranuclear inclusions in brain [138,139]. But the toxicity of CGG RNA repeats was first demonstrated in transgenic flies. The ubiquitous or neuronal expression of untranslated (CGG)<sub>90</sub> in *Drosophila* was lethal, while expression in the retina caused a neurodegenerative eye phenotype in association with the accumulation of cytoplasmic and nuclear inclusions positive for ubiquitin, Hsp70 and proteasome components [140]. Similarly, mice expressing a CGG repeat expansion, either in the context of the murine *Fmr1* gene or in the 5'UTR of an unrelated gene demonstrated that these RNA repeats were sufficient to cause learning and neuromotor deficits [141,142], in association with increased *Fmr1* mRNA levels and intranuclear inclusions in brain [141,143] (Table 1).

A number of studies have focused on the identification of proteins that interact with the expanded CGG RNA repeats, which could mediate *trans*-dominant RNA toxicity in this condition. Purine-rich element binding protein A (PURA/Pur $\alpha$ ) interacts with CGG repeats and localises with CGG-containing RNA foci in FXTAS brain tissue [144]. The neurological phenotype of Pur $\alpha$  knock-out mice [145] and the rescuing of the phenotype of CGG transgenic flies by Pur $\alpha$  overexpression [144] further supported a *trans*-acting mechanism of RNA toxicity. Other disease modifiers have been identified, through their ability to suppress the eye neurodegenerative phenotype of CGG transgenic flies, such as hnRNP A2/B1, CELF1, Hsp70 and several histone deacetylases (HDACs) [140,144,146,147]. More than 20 proteins co-localise with FXTAS intranuclear inclusions, such as the splicing regulators Sam68 (KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1, KHDRBS1) and MBNL1 [148,149] (Fig. 3). Protein sequestration inactivates Sam68, resulting in dysregulation of Sam68-dependent splicing [149], but it is unknown whether Sam68-regulated splicing events are relevant to disease symptoms. Future studies are also needed to elucidate the contribution of other abnormal RNA–protein interactions to cell dysfunction and disease phenotypes in FXTAS.

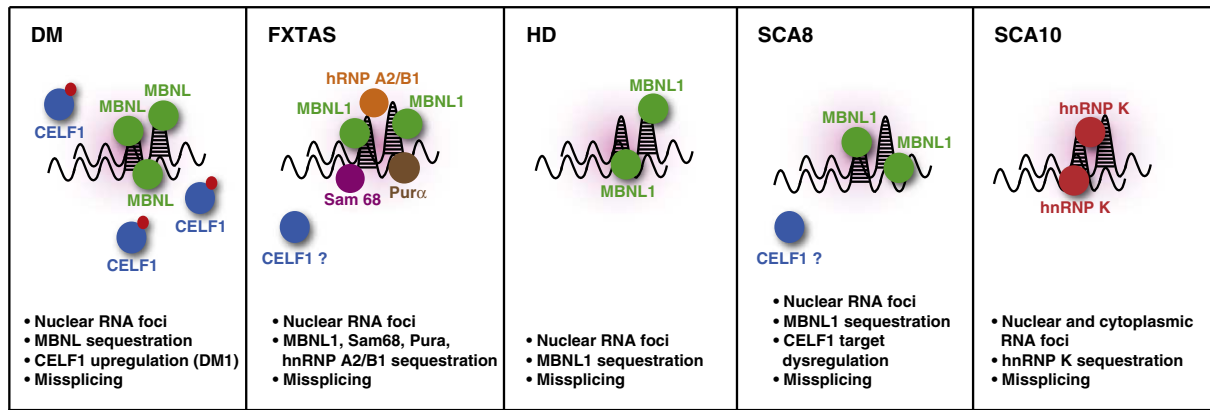
Similar to DM, FXTAS disease mechanisms involve nuclear accumulation of toxic RNA transcripts, protein sequestration of splicing regulators and subsequent spliceopathy. However, the protecting effect of CELF1 overexpression in (CGG)<sub>90</sub> transgenic flies suggests fundamental differences between DM1 and FXTAS disease mechanisms. Moreover, in contrast to CUG and CAG repeats, the co-expression of CGG and GCC complementary repeats suppressed the individual toxicities of the repeats [150].

### 5.2. Spinocerebellar ataxia type 8 (SCA8)

SCA8 is a late-onset disorder characterised by a slow and progressive form of cerebellar ataxia and neurodegeneration. SCA8 is caused by a CTG·CAG repeat expansion transcribed in both directions, producing a CUG ATXN8OS transcript and a CAG ATXN8 transcript [151].

As in DM1, the CUG RNA accumulates in nuclear foci, sequesters MBNL proteins and triggers splicing abnormalities, notably in the cerebellum [26]. In addition, putative CELF1 targets appear to be abnormally expressed in SCA8 [26], but it remains to be shown whether CELF1 itself is affected in this condition (Fig. 3). Evidence of the toxic role of SCA8 transcripts was also reported in *Drosophila*. The expression of short and expanded non-coding CUG-containing SCA8 transcripts in the photoreceptor neurons results in progressive neurodegeneration of the retina [152]. Consistent with a mechanism mediated by toxic RNAs, a genetic screening of disease modifiers in *Drosophila* identified several RNA binding proteins, including *muscleblind* and *staufer* [152] (Table 1).

The translation of the CAG ATXN8 RNA produces a nearly pure polyglutamine tract that accumulates in intranuclear protein inclusions, like in many other SCAs [153]. Transgenic mice expressing a SCA8 (CTG·CAG)<sub>118</sub> in both directions, recapitulate capital disease features, including progressive neurological phenotypes and cerebellar neurodegeneration, in association with intranuclear CUG-containing



**Fig. 3.** Comparative schematic representation of the mechanisms of RNA toxicity operating in DM, FXTAS, SCA8, SCA10 and polyglutamine expansion diseases. The accumulation of expanded transcripts (mostly in ribonuclear aggregates or foci) and the functional dysregulation of RNA-binding proteins appear to be a common feature of many RNA toxic diseases. Most proteins are functionally disturbed by sequestration into RNA foci resulting in splicing dysregulation – a common event in toxic RNA diseases. Some proteins appear to be involved in multiple disease mechanisms, such as the members of the MBNL and CELF protein families. CELF1 (and CELF2) is upregulated in DM1, and it is also likely to be involved in FXTAS and SCA8 disease mechanisms.

RNA foci and polyglutamine aggregates [26,153] (Table 1). Interestingly, reduced MBNL1 protein levels, resulting from the inactivation of one *Mbnl1* allele, accentuated rotarod deficits in SCA8 transgenic mice, suggesting that the CUG-containing SCA8 transcripts affect MBNL1-regulated pathways in the brain [26]. SCA8 mice provided definitive evidence that both mechanisms of RNA and protein toxicity can operate in a single neurological disease, as a result of the production of sense and antisense transcripts.

Protein toxicity in SCA8 does not seem to be limited to the accumulation of polyglutamine tracts, and may result from non-orthodox translational mechanisms. This was first detected when investigating the contribution of ataxin 8 protein to SCA8 pathogenesis, through the transfection of expanded CAG-containing *ATXN8OS* constructs lacking the ATG initiation codon into cultured cells. Unexpectedly, the mutation of the ATG codon did not prevent translation of the expanded construct in the three possible reading frames, generating polyglutamine, polyserine and polyalanine homopolymers through unconventional repeat-associated non-ATG-mediated (RAN) translation [154]. The accumulation of RAN-translated proteins was confirmed in the brain of SCA8 patients and transgenic mice [154]. The involvement of this mechanism was investigated in DM1, resulting in the detection of a novel polyglutamine peptide in relevant tissues from DM1 patients and DMSXL transgenic mice [154], presumably resulting from the translation of the CAG-containing antisense *DMPK* transcripts. RAN translation was shown to occur in other disease-relevant sequence contexts in cell culture, but it has not been confirmed yet in human patient samples or in transgenic models of the disease. Despite some evidence of apoptosis in response to RAN translation, we still do not know the frequency and contribution of these peptides to disease pathogenesis. The validation of RAN translation in other human diseases and its implications to cell dysfunction and disease pathogenesis could change our understanding of trinucleotide repeat expansion disorders.

### 5.3. Huntington-disease like 2 (HDL2)

HDL2 is a neurodegenerative disorder clinically very similar to HD, and characterised by chorea, dystonia, psychiatric manifestations and dementia. Pathologically, HDL2 brains accumulate ubiquitin-positive intranuclear inclusions, suggesting HD-like disease mechanisms mediated by toxic polyglutamines [155]. HDL2 is caused by a CTG·CAG repeat expansion mutation in the *junctophilin-3* (*JPH3*) gene that is transcribed in both senses to generate CUG- and CAG-containing transcripts [156]. Depending on the alternative splicing, the CUG

repeat of the sense *JPH3* transcript can either encode a polyalanine or a polyleucine tract, or even be placed within the 3'UTR of the transcript [156].

The existence of expanded CUG repeats hinted at mechanisms of RNA toxicity in HDL2. In favour of this hypothesis, nuclear RNA foci were detected in neurons of HDL2 patients, co-localising with MBNL1 [31]. Like in DM1, CELF1 was not present in HDL2 RNA foci, but this does not exclude a role of abnormal CELF1 stability or localisation in this condition (Fig. 3). The transfection of mutant CUG-containing *JPH3* transcripts (genetically modified to prevent transcription) dysregulated MBNL1-dependent alternative splicing in cultured cells. The toxicity of expanded CUG-containing *JPH3* transcripts was confirmed in BAC transgenic mice, which exhibited motor and neuropathological phenotypes, associated with the accumulation of MBNL1-containing RNA foci [157] (Table 1). In addition, nuclear retention of *JPH3* transcripts can also affect protein levels and contribute to disease pathogenesis. In fact, *JPH3* loss of function was found deleterious in knock-out mice, causing relevant progressive motor deficits [158].

Polyglutamine aggregates accumulate in HDL2 mice, co-localise with ubiquitin and are independent of RNA foci, strongly suggesting a pathogenic role for a novel antisense CAG-containing *JPH3* transcript that emanates from the HDL2 locus [157,158]. In further support of polyglutamine-mediated mechanisms, targeted silencing of the CUG-containing *JPH3* sense transcript in HDL2 transgenic mice rescued neurodegeneration but did not abrogate motor deficits or neuropathology [157], indicating that the expanded polyglutamine protein is sufficient to induce certain HDL2 features.

In summary, HDL2 mice provided evidence of a multi-component pathogenic mechanism, involving CUG-mediated spliceopathy, *JPH3* loss of function through nuclear RNA retention, and polyglutamine toxicity. Comparative studies of the pathogenic pathways shared between HDL2, DM and HD may provide insight into unifying mechanisms underlying these disorders.

### 5.4. Spinocerebellar ataxia type 10 (SCA10)

MBNL sequestration into ribonuclear inclusions is a shared event across the molecular mechanisms of DM, FXTAS, SCA8 and HDL2 (Fig. 3). However other toxic RNA diseases that show RNA foci accumulation and missplicing involve abnormal nuclear sequestration of different RNA-binding proteins.

SCA10 is a neurodegenerative disease, characterised by progressive cerebellar ataxia and seizures. SCA10 patients carry a non-coding



ATTCT pentanucleotide expansion in the *ataxin 10* (*ATXN10*) gene, whose function is not fully understood [159]. The expanded *ATXN10* is transcribed, spliced and translated normally. In addition, mice heterozygous for the *Atxn10* deficiency have a normal phenotype, demonstrating that haploinsufficiency does not play a major role in disease pathogenesis [160]. Instead, the intronic localisation of the repeat and the accumulation of AUUCU-containing *ATXN10* transcripts in the nucleus and cytoplasm of SCA10 fibroblasts [27] are consistent with a toxic gain of function. The toxicity of the SCA10 RNA repeat was demonstrated through the generation of independent transgenic mouse lines expressing AUUCU expansions within an intron or within the 3'UTR of unrelated genes (Table 1). Both mouse models exhibited nuclear and cytoplasmic RNA foci accumulation [27,161]. The 3'UTR model, in particular, developed an ataxic and epileptic phenotype resembling SCA10 disease symptoms [161]. hnRNP K was found to bind AUUCU repeats *in vitro* and to co-localise with SCA10 RNA foci in SCA10 human fibroblasts and transgenic mouse brains [27,161]. hnRNP K sequestration resulted in decreased protein activity and missplicing of hnRNP K-regulated transcripts [27] (Fig. 3). In addition, the abnormal interaction of hnRNP K with the expanded repeat induced PKC $\delta$  translocation into the mitochondria, activation of apoptosis in transfected neuroblastoma cell lines [27] and it is associated with neuronal loss in transgenic mouse brains [161]. Both transgenic lines confirmed that expanded SCA10 repeats triggered pathogenic events mediated by toxic AUUCU RNA repeats, regardless of the location of the expansion within the transgene. Nevertheless, some important questions require further investigation. The contribution of hnRNP K loss of function to the SCA10 phenotype might be addressed through the generation of hnRNP K-deficient mice, and the comparative study with the AUUCU-expressing lines.

Additional mouse lines expressing the AUUCU repeat expansion in the mouse or human genomic context might prove useful to identify disease intermediates and to elucidate the biological pathways affected by the SCA10 expansion mutation. Interestingly, the pan-neuronal expression of untranslated AUUCU expanded repeats in *Drosophila* elicits a number of transcriptional changes that are also found in fly lines expressing toxic CUG and CAG repeats [162]. These results suggest some degree of overlapping in the downstream mechanisms of disease triggered by different toxic RNA repeats.

### 5.5. Spinocerebellar ataxia type 12 (SCA12)

Circumstantial data support RNA-mediated pathogenesis in other human diseases, but relevant animal models have not yet provided definitive evidence of toxic RNA gain of function.

SCA12 patients exhibit heterogeneous clinical manifestations, including typical ataxia, prominent action tremor of the upper limbs, parkinsonism, psychiatric disorders and dementia in patients with a long disease-course [163]. The disease is caused by a CAG trinucleotide repeat expansion in the 5'UTR of the *PPP2R2B* (*protein phosphatase 2, regulatory subunit B, beta*) gene, which has multiple alternative sites of transcription initiation and alternative exons [164]. The CAG repeat can be located just upstream of the transcriptional start site of the B $\beta$ 1 transcript, or within the first intron of the B $\beta$ 2 splicing variant [163]. The expansion increases the expression of the B $\beta$ 1 variant [165], but the impact of the upregulation of this isoform is not known. In contrast, the overexpression of the CAG-containing B $\beta$ 2 isoform in *Drosophila* causes mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neuronal death [166] (Table 1). Since it is not known whether B $\beta$ 2 expression levels are changed in SCA12, the implications of these findings to the human pathology remain elusive. Nonetheless, the toxic effect of the intronic CAG repeat in this isoform is compatible with a toxic RNA gain of function. It remains to be investigated whether expanded transcripts accumulate in SCA12 cells and disturb RNA-binding proteins through abnormal interactions. Relevant animal models carrying the SCA12 CAG repeat expansion within its natural genomic context must be generated to understand the molecular basis of this disorder.

### 5.6. Spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31)

SCA31 is a pure cerebellar ataxia, affecting primarily Purkinje cells. The disease is associated with the insertion of a complex pentanucleotide repeat insertion containing a (TGGAA)<sub>n</sub> sequence [29]. The TGGAA repeat is located in the introns of two genes transcribed in opposite directions: the *thymidine kinase 2* (*TK2*) and the *brain expressed, associated with Nedd4* (*BEAN*) genes. The repeat insertion does not affect the expression or the splicing of these genes, but *in situ* hybridisation revealed nuclear accumulation of UGGAA-containing *BEAN* transcripts in RNA foci [29]. In addition, UGGAA RNA repeats bind serine/arginine-rich splicing factors 1 and 9 (SRSF1 and SRSF9) *in vitro*, possibly perturbing RNA metabolism further downstream [29]. Although there is no animal model to demonstrate the *trans*-acting toxicity of the UGGAA RNA repeats in SCA31, indirect evidence points in that direction. The overexpression of the non-coding *hsr $\omega$*  RNA (rich in UGGAA repeat sequences) exacerbates neurodegeneration in a fly model of polyglutamine disease [167], and suggests a deleterious role of the UGGAA repeats. In further support of RNA toxicity, inactivation of the SRSF1 and SRSF9 homologues in *C. elegans*, *Drosophila* and mouse induces neuronal cell death, abnormal development and early mortality [168–170].

The generation of animal models is essential to experimentally address the sequence of events in SCA31 pathogenesis, and the toxic role of UGGAA repeats.

### 5.7. Spinocerebellar ataxia type 36 (SCA36)

SCA36 is a slowly progressive cerebellar ataxia with characteristic motor neuron involvement [171]. The disease-causing mutation was mapped to an intronic expansion of a GGCTG hexanucleotide repeat in the first intron of the *NOP56* ribonucleoprotein gene, a component of the splicing machinery [30]. The repeat expansion does not change the expression or the splicing profile of *NOP56*, but it induces the nuclear accumulation of GGCCUG RNA foci in lymphoblastoid cell lines derived from SCA36 patients [30]. SRSF2 binds to the SCA36 repeat *in vitro* and partially co-localises with RNA foci *in vivo* [30]. In addition, the expansion downregulates miR1292, a microRNA located immediately downstream to the repeat [30]. As a result, SCA36 molecular pathogenesis might result from the combinatorial effect of toxic RNA mechanisms mediated by sequestration and inactivation of SRSF2 splicing regulator, and the dysregulation of miR1292 targets. So far no animal model has been generated to explore the contribution of these two pathways to disease development.

### 5.8. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterised by a selective degeneration of motor neurons. Several families present a combination of frontotemporal dementia (FTD) with ALS symptoms [172]. Recently, the abnormal expansion of a GGGGCC hexanucleotide repeat has been identified as the most frequent genetic cause of both conditions [32,173]. Two possible mechanisms might be involved. One of them suggests that *C9ORF72* transcripts containing intronic GGGGCC repeat expansions accumulate in the nucleus of human brain cells and spinal cord [32], predicting a disease mechanism mediated by RNA toxicity. The GGGGCC motif predicts the potential binding of hnRNP A2/B1 and SRSF1 [32], establishing possible similarities with FXTAS and SCA31, respectively. An alternative mechanism of loss of function is grounded on the 50% reduction of at least one of the *C9ORF72* transcripts in expanded repeat carriers [32,173]. The development of cell and animal models, either through inactivation of *C9ORF72* or overexpression of expanded transcripts, may help to resolve disease pathobiology, and aid in identifying RNA-interacting proteins involved in repeat-associated ALS/FTD pathogenesis.

### 5.9. Other trinucleotide repeat expansion disorders

A subset of DM-associated splicing events also occurs in a transgenic mouse model of SBMA, which carries a coding CAG repeat expansion in the mouse *androgen receptor (Ar)* gene. These splicing abnormalities are associated with CELF1 upregulation [174]. However, in contrast with DM, expanded RNA transcripts do not accumulate in nuclear foci, neither has an antisense RNA been detected in transgenic mice, discarding a deleterious effect of CUG RNA repeats. The expression of expanded CAG-containing transcripts is not sufficient to induce missplicing in SBMA. Instead, splicing dysregulation appears to be directly mediated by the expanded polyglutamine protein [174], possibly through its abnormal and uncharacterised interactions with CELF1.

Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) is a late-onset autosomal dominant disease characterised by progressive ptosis, dysphagia and limb muscle weakness. OPMD is caused by the abnormal expansion of a polyalanine tract in N-terminal of the poly(A)-binding protein, nuclear 1 (PABPN1) [175]. Although missplicing has not been described in OPMD, CELF1 is upregulated in cell models [176], raising the possibility of pathogenic events shared with DM1. However, in contrast with DM1, CELF1 co-localises with the characteristic intranuclear inclusions that accumulate in muscle of OPMD patients [176]. CELF1 upregulation might result from a compensatory mechanism to counteract the sequestration of this splicing factor. The opposing effects of CELF1 sequestration and upregulation make it difficult to estimate the outcome on CELF1 activity. Transgenic mice expressing an expanded human *PABPN1* gene [177] could help in addressing this question and the study of CELF1 targets in OPMD.

Animal models have provided evidence to support some unifying aspects shared by toxic RNA disorders (Fig. 3). Despite some recurrent themes, such as RNA accumulation and abnormal protein interactions, disease-specific variations make each human condition unique, and make it difficult to conceive a universal pathway of molecular pathogenesis.

## 6. Unfitting pieces of the puzzle: Unresolved questions

The work in DM1 had driven us towards a prevalent model of RNA-mediated pathogenesis centred on the abnormal accumulation of toxic transcripts in the cell, and the establishment of deleterious RNA–protein interactions. As a result, disturbed RNA-binding proteins disrupt proper cell functions leading to the onset of disease symptoms. However, some experimental observations do not fit this model, raising relevant questions that will contribute to a better understanding of disease mechanisms.

Despite the central role of RNA foci and MBNL1 sequestration (Fig. 3), animal models have demonstrated that these disease features are neither sufficient nor required to elicit a phenotype (Table 1). Transgenic flies expressing untranslated CUG repeats and accumulating muscleblind-containing nuclear RNA foci developed no phenotype, showing that ribonuclear aggregates are not always causative of disease [67]. Conversely, DM-associated phenotypes have been recreated in transgenic mice that overexpress short CTG repeats in the absence of morphological foci and MBNL sequestration [178]. The surprising phenotype of mice expressing short triplet repeats likely reflects the high expression levels of the transgene. Indeed, the comparison of CUG-containing transcripts between different transgenic models by northern blot analysis revealed higher expression in the skeletal muscle of conditional mice expressing short *DMPK* transcripts than in any other mouse model tested [178]. The overexpression of wild-type *DMPK*-3'UTR carrying short CTG repeats may therefore be pathogenically equivalent to the expression of fewer transcripts carrying large CTG expansions.

Given the dissociation between foci formation and the disruption of alternative splicing in transfected cell cultures [129] and in a DM1

mouse model [178], the contribution of *Cnbp* haploinsufficiency to the DM2 phenotype has been investigated. Heterozygous *Cnbp*<sup>+/-</sup> mice developed relevant DM phenotypes, such as myotonia, ocular cataracts, cardiac arrhythmia, defective walking, both proximal and distal muscle wasting as well as histological abnormalities in skeletal muscle and heart [179]. The development and characterisation of this transgenic line has raised questions about the unresolved effect of the CCTG tetranucleotide repeat expansion on *CNBP* expression levels in DM2 patients. While total *CNBP* protein and transcript in human DM2 muscle samples and cell cultures appeared originally unchanged [180,181], others have then reported reduced levels in DM2 myoblasts [182] and muscle biopsies [183]. Although toxic RNA effects likely explain the overlapping phenotypes between DM1 and DM2, abnormal *CNBP* levels in DM2 may account for disease-specific manifestations. The unexpected role of *CNBP* haploinsufficiency in DM2 pathogenesis may prompt us to revisit an old question: what if the decreased expression of *DMPK* and *SIX5* reported in DM1 contributed to disease phenotypes [184–187]? Knock-out mice showed that *Dmpk* and *Six5* inactivation *per se* were not the primary cause of disease [188–191]. However, the late muscle and cardiac abnormalities in these lines do not exclude an increased susceptibility to disease in the presence of toxic repeats. This hypothesis could be addressed through the inactivation of *Dmpk* and *Six5* in CUG-expressing mice. If a contributing role is found for *Dmpk* or *Six5*, therapies targeting toxic RNA must be reassessed and possibly complemented with strategies to compensate *DMPK* and *SIX5* decreased levels.

Finally, attractive as it is, the unpredicted RAN translation of expanded transcripts brings up another unresolved question: how can expanded RNA repeats trapped in the cell nucleus be translated into protein? The labile nature of nuclear RNA aggregates, as constantly forming and disaggregating structures [192], may provide an answer. Expanded RNA transcripts might be temporarily free in the cell and not always stuck in the nucleus, allowing not only RAN translation to occur, but also the establishment of abnormal interactions with proteins that may selectively bind to soluble RNA. Interestingly, a screening for MBNL1-interacting partners affected by the CTG repeat expansion identified multiple proteins that contribute to DM1 spliceopathy without co-localising with RNA-foci [193], like CELF1. These observations are consistent with a role for soluble expanded RNA transcripts in pathogenic events outside ribonuclear aggregates, where they may participate in disease-associated molecular events.

## 7. Hitting where it hurts: Therapeutic targeting of toxic RNA

Symptomatic medication is available for some RNA-mediated disorders, but in general it is only moderately effective, because it interferes with events far downstream of the primary cause of disease. However, insight into the pathobiological cascade has identified molecular events that could potentially be targeted by novel therapeutic strategies – this is particularly true in the case of DM. The rational design of molecular therapies *in vitro* or *in vivo* has been reviewed elsewhere [66,194,195]. In the following section we will concentrate on the contribution of animal models of toxic RNA to the development of approaches to neutralize the deleterious effects of expanded transcripts, focusing mainly on DM as the paradigm of toxic RNA disorders (Table 2).

### 7.1. Reversible nature of the DM phenotype

The use of animal models provided evidence that CUG-induced toxicity can be suppressed, opening avenues to the development of novel molecular therapies. Conditional transgenic mice overexpressing high levels of short *DMPK* transcripts display many of the phenotypes observed in DM1 patients, including cardiac conduction deficits, myotonic discharges, muscle weakness, splicing abnormalities, histopathologic changes and CELF1 upregulation (but no RNA foci or MBNL

**Table 2**  
Examples of therapeutic strategies developed to target RNA toxicity in animal models of disease.

Therapeutic strategies	Strategy; type of administration	Mouse model	Effect on RNA foci	Effect on splicing	Effect on phenotype	References	
Shutting down gene expression (proof of principle experiment) MBNL1 expression restoration	Inducible transgene construct	(CTG) <sub>5</sub> overexpression	Not applicable	Reversion of missplicing	Correction of myotonia and cardiac conduction defects	[178]	
	MBNL1 overexpression; AAV-mediated muscular infection	HSA <sup>LR</sup>	Diffuse MBNL1 distribution	Reversion of missplicing	Correction of myotonia	[196]	
MBNL1 expression restoration	MBNL1 overexpression; breeding with overexpressing mouse line	HSA <sup>LR</sup>	Foci present in MBNL1-overexpressing mice	Missplicing prevented	Correction of myotonia and myopathy	[197]	
	Use of PKC inhibitors; i.p. injection	EpA960	No change	Reversion of CELF1-dependent missplicing	Improved survival and cardiac function.	[199]	
CELF1 normal phosphorylation restoration	Use of PKC inhibitors; i.p. injection	EpA960	No change	Reversion of CELF1-dependent missplicing	Improved survival and cardiac function.	[199]	
CELF1 inactivation	Expression of CELF1 dominant negative; breeding with CELF1Δ mouse line	HSA <sup>LR</sup>	Not reported	Reversion of CELF1-dependent missplicing	Not reported	[200]	
Elimination of the toxic transcripts (unknown mechanism or RNase H-mediated)	ASO; intramuscular injection	HSA <sup>LR</sup>	40% reduction in MBNL1-positive foci; 50% reduction in expanded CUG transcripts	Reversion of missplicing	No correction of myotonia	[34]	
	ASO; intramuscular injection	EpA960 (muscle expression)	40% reduction in number of foci per cell; 50% reduction in expanded CUG transcripts	Slight reversion of missplicing	Gapmers induce histological changes in muscle	[37]	
	siRNA; intramuscular injection	HSA <sup>LR</sup>	Smaller and fewer foci; 70–80% reduction of expanded CUG RNA	Reversion of missplicing	Correction of myotonia	[204]	
	ASO; systemic administration	HSA <sup>LR</sup>	Smaller and fewer foci detected; 80% reduction in expanded CUG transcripts	Reversion of missplicing	Sustained correction of myotonia	[36]	
Block the access to RNA binding proteins	U7-snRNP; lentiviral mediated transduction	Only in cultured DM1 muscle cells	~60% reduction in foci number; 70–80% reduction in expanded <i>DMPK</i> transcripts	Reversion of missplicing	Strategy only tested <i>in cellulo</i>	[203]	
	ASO; intramuscular injection	HSA <sup>LR</sup>	Reduction in foci number; 50% reduction in expanded CUG transcripts	Reversion of missplicing	Correction of myotonia	[35]	
	ASO; i.v. injection	HSA <sup>LR</sup>	Reduction in foci number; 50% reduction in expanded CUG transcripts	Reversion of missplicing	Correction of myotonia	[205]	
	Pentamidine; i.p. injection	HSA <sup>LR</sup>	Reduction in number of foci (in cultured cells)	Partial reversion of missplicing	Not reported	[207]	
	Hoechst 33258 variants; i.p. injection	HSA <sup>LR</sup>	Reduction in number of foci (in cell culture model of DM1)	Partial reversion of missplicing	Not reported	[210]	
	D amino acid hexapeptide; oral administration	(CUG) <sub>480</sub> expressing <i>Drosophila</i>		70% reduction in foci number	Not reported	Suppression of lethality and muscle degeneration	[38]
	D amino acid hexapeptide; intramuscular injection	HSA <sup>LR</sup>		Reduction in foci number	Partial reversion of missplicing	Correction of histopathology	
Reduction of trinucleotide repeat expansion	ASO; intramuscular injection	DM300	Reduction in number of foci (in cultured cells)	Not reported	Stabilisation of expanded CTG DNA repeats	[206]	

sequestration). Shutting down transgene expression and production of toxic RNA in this inducible line led to suppression of the phenotype [178]. This result provided proof of principle that DM-associated symptoms are reversible through direct targeting of the primary pathogenic molecule: the toxic RNA (Table 2).

Phenotype reversal can also be attained by the modulation of the levels and/or activity of splicing factors affected by disease pathogenesis. The overexpression of MBNL1 in transgenic flies [68] and mice [196] expressing toxic CUG transcripts corrected their DM-associated phenotypes. MBNL1 overexpression in the skeletal muscle of *HSA<sup>LR</sup>* transgenic mice was initially achieved through local injection of recombinant adeno-associated viral vectors, and resulted in correction of adult splicing and suppression of myotonia [196]. Later, the generation of an overexpressing line demonstrated that systemic and sustained MBNL1 overexpression is well tolerated, and it confirmed the therapeutic benefits of MBNL1 replacement in the skeletal muscle of DM1 mouse models [197]. The benefits of elevated MBNL1 overexpression in other tissues and organ systems remain to be assessed. Since MBNL1 sequestration by RNA foci has also been implicated in SCA8, HDL2 and FXTAS, this strategy might be of value in other human diseases. The situation is less clear in CAG expansion disorders. Despite MBNL1 sequestration by CAG-containing foci, contradictory results have been reported upon overexpression in animal models of CAG toxicity: while rescuing the phenotype of transgenic *C. elegans* [198], it enhances neurodegeneration in CAG transgenic flies [74].

Pharmacological modulation of CELF1 steady-state levels in the heart of transgenic mice expressing expanded CUG transcripts has pointed to CELF1 as another putative therapeutic target. The signalling pathway triggered by the expression of expanded CUG transcripts and leading to PKC-mediated CELF1 hyperphosphorylation remains unknown. Nevertheless, the administration of PKC inhibitors to induced EpA960 mice decreased CELF1 hyperphosphorylation, reduced protein steady-state levels in heart, corrected CELF1-dependent alternative splicing, and improved the cardiac conduction and contractile abnormalities [199]. Similarly, the expression of a CELF1 dominant negative protein in skeletal muscle rescued splicing dysregulation of CELF1-dependent targets in *HSA<sup>LR</sup>* mice, expressing toxic repeats [200].

The implications of CELF1 in other toxic RNA diseases are unclear. In contrast to DM1, CELF2 upregulation has not been reported in DM2 [51] and it may even have a protective role in other conditions, such as FXTAS [146]. Furthermore, while CELF1 is an important disease intermediate in heart and skeletal muscle, other members of the CELF family may play predominant roles in other tissues, such as CELF2 in the CNS [60]. In conclusion, the use of CELF downregulation therapies requires further investigation in DM.

Increased levels of STAU1 (stauferin, RNA binding protein, homolog 1) have also been found in the skeletal muscle of DM1 patients and *HSA<sup>LR</sup>* mice [201]. But in clear contrast to the role of CELF1 in DM1, STAU1 upregulation is likely protective, since it enhances nuclear export and translation of CUG-containing transcripts trapped in the nucleus [201]. STAU1 overexpression may therefore provide an alternative therapeutic strategy, which can now be tested in other DM1 animal models.

Rather than establishing the grounds of future therapies, these results provided important proof of principle of the reversibility of disease, and opened new avenues to the development of promising therapeutic strategies. These can be broadly grouped into strategies to degrade the expanded RNA or to inhibit its toxic effects in the cell.

## 7.2. Degradation of pathogenic RNA

The development of antisense technology allows direct targeting of toxic RNA transcripts. To be effective as therapeutics, antisense oligonucleotides (ASO) must reach and selectively hybridise to the target RNA. This requires sufficient half-life within tissues, appropriate biodistribution and efficient uptake. Chemical modifications can be introduced into ASO molecules to optimise these parameters,

increase their efficiency and minimise off-target effects [202]. As a result, modified ASO have been successfully used in transgenic mouse models of DM1 to eliminate toxic CUG transcripts.

2'-O-methyl phosphorothioate-modified (2OMe) ASO have been developed to directly target the expanded CUG RNA expansion, using a (CAG)<sub>7</sub> sequence design. Local administration of 2OMe oligonucleotides into the skeletal muscle of DM1 mouse models expressing non-coding CTG expansions, reduced the levels of the toxic transcripts by ~30–70% [34]. As a result, the number of RNA foci decreased significantly, MBNL1 displayed a more diffuse distribution and typical DM1 splicing abnormalities improved, albeit to a degree that was not sufficient to reduce myotonia [34] (Table 2).

It is important to note that DM1 patients carry a functional copy of the *DMPK* gene. Although full *Dmpk* depletion in mice produces only a mild phenotype at later ages [188,189], ASO-based therapies must specifically mark the expanded RNA for degradation, leaving the non-expanded as well as other short CUG-containing transcripts intact. The short CAG repeat sequences in the 2OMe ASO used in this study allowed specificity for the mutant RNA, over transcripts containing short CUG repeats [34], limiting off-target effects. Similarly, CAG-containing U7-snRNA antisense sequences specifically targeted the expanded *DMPK* mRNA in cultured DM1 muscle cells (Table 2), while preserving the levels of the short *DMPK* RNA molecules [203]. The benefits of lentiviral-mediated delivery of U7-snRNA in DM1 transgenic mice must be evaluated.

Alternatively, specificity towards the pathogenic transcript might be grounded on the nuclear location of expanded *DMPK* transcripts and activation of RNase H-mediated pathways of RNA degradation. Since RNase H is enriched in the nucleus, it might be particularly efficient to degrade transcripts that accumulate in the nucleus of DM1 cells. To test this hypothesis, gapmer ASO containing CAG sequences have been designed to activate RNase H-mediated degradation. Local injection of gapmer ASO into the skeletal muscle of EpA960 mice was sufficient to decrease the levels of expanded transcript by 50%, reduce the number of foci per nucleus and to induce partial correction of DM1-associated spliceopathy [37] (Table 2).

In addition to ASO strategies, siRNA duplexes have also been used to induce selective cleavage of expanded CUG transcripts. The intramuscular injection of a siCAG in *HSA<sup>LR</sup>* mice resulted in a 70–80% reduction in toxic transcripts, decreased number of foci and correction of missplicing and myotonia [204] (Table 2).

Despite these encouraging results, the development of efficient therapies for DM was still facing an important challenge: DM is not only a muscle disease, but it affects many other tissues, such as the CNS and heart. Administration, biodistribution and stability of the therapeutic agent must be optimised to reach all the affected tissues. Although expressing CUG toxic transcripts specifically in the skeletal muscle, the *HSA<sup>LR</sup>* mice have offered means to test systemic routes of administration. The subcutaneous injection of modified ASO (compatible with RNase H activity) into *HSA<sup>LR</sup>* mice resulted in a robust and sustained decrease of toxic RNA levels by 80%, decrease in RNA foci, improvement of alternative splicing, elimination of myotonic discharges and normalisation of the transcriptome (Table 2). The effect was detected two weeks following ASO administration and persisted over one year, demonstrating the selective susceptibility of nuclear trapped transcripts to RNase H-dependent degradation, as well as the long-term stability and bioactivity of the ASO molecules [36]. Similarly, systemic delivery of CAG-containing morpholinos (see Section 7.3) by intravenous injection redistributed MBNL1 protein, corrected alternative splicing and eliminated myotonia in *HSA<sup>LR</sup>* mice [205]. Together, these results show that the physiological benefits of the therapeutic molecules do not require direct administration into the affected tissue (the skeletal muscle in *HSA<sup>LR</sup>* mice). Instead ASO are properly distributed and efficiently diffused from the injection site, to reach distant tissues, while keeping their biological activity. Nonetheless, the encouraging biodistribution of these



molecules do not preclude the need to test these therapeutic agents in multisystemic mouse models, expressing the toxic CUG RNA in numerous tissues and organs. A similar approach might be effective in other genetic disorders characterised by the nuclear accumulation of toxic RNA, such as FXTAS, SCA8 and ALS/FTD.

### 7.3. Inhibition of abnormal and pathogenic RNA–protein interactions

A second approach to reduce RNA dominance involves the prevention of abnormal interactions between toxic transcripts and RNA-binding proteins, either through the use ASO working by steric hindrance or small molecules

(CAG)<sub>25</sub> morpholino ASO were designed to bind CUG RNA repeat expansions with high affinity. Local injection of (CAG)<sub>25</sub> morpholino ASO into the skeletal muscle of *HSA<sup>LR</sup>* transgenic mice inhibited the binding of MBNL1 to the expanded RNA and redistributed the MBNL1 protein. The partial correction of spliceopathy was sufficient to eliminate myotonia. The treatment has also resulted in an unexpected 50% reduction in the levels of the expanded RNA, but left the endogenous transcripts containing short CUG repeats unaltered [35]. Interestingly, this oligonucleotide treatment not only halts RNA toxicity events, but it also suppresses somatic repeat expansion [206]. This result suggests that ASO can modify trinucleotide repeat dynamics *in vivo*, providing means to stabilise the repeat at subpathogenic repeat lengths and delaying disease onset (Table 2).

The high cost and pharmacological challenges of ASO-based therapies steered some laboratories to search for alternative approaches. The use of small molecules, for which delivery methods and biodistribution is less problematic, would present an advantage over ASO protocols. A chemical screening identified pentamidine as a small compound with a high affinity for CUG repeats, capable of inhibiting MBNL1 binding and sequestration by toxic RNA (Table 2). Although reverting the spliceopathy in the skeletal muscle of *HSA<sup>LR</sup>* mice [207], the therapeutic use of pentamidine is limited by its high toxicity. The rational design of bioactive molecules that target both DM1 and DM2 expanded RNA with high affinity resulted in the identification of non-toxic molecules that inhibit the CUG–MBNL1 interaction, such as benzo[g]quinoline derivatives [208], and Hoechst 33258 variant molecules [209]. Unfortunately, the improvement of MBNL1-dependent splicing events in *HSA<sup>LR</sup>* mice following administration of some of these compounds was modest [208]. Improved pentamidine and Hoechst 33258 ligands were identified by computational searches for chemical similarity. One of these ligands partially reversed DM1-associated missplicing when injected intraperitoneally in *HSA<sup>LR</sup>* mice [210]. Other bioactive small molecules have been reported to specifically interact with CUG, CAG and CGG expanded RNA repeats and reverse missplicing in cell culture [211–213]. Their efficacy in animal models remains to be tested.

Transgenic flies expressing an interrupted CUG expansion also helped in the identification of a small hexapeptide that redistributes muscleblind, reduces the number of RNA foci and suppresses the CUG-induced phenotype in the brain, muscle and eye of transgenic *Drosophila* (Table 2). In *HSA<sup>LR</sup>* mice, local administration of the peptide in skeletal muscle restored MBNL1 function, reversed missplicing and centronucleopathy for at least four weeks after injection [38]. The benefits of systemic administration in skeletal muscle and other tissues must be addressed in DM1 mouse models expressing toxic transcripts in multiple tissues.

Advances in the understanding of the molecular bases of DM, coupled with the progress made in the development of means to target RNA molecules *in vivo*, have led to the prospect of novel therapies for DM (Table 2). The pre-clinical success of therapeutic strategies in DM1 mouse models is remarkable, and moves us closer to the long-awaited clinical trials in humans. Nevertheless, these molecules are still facing some significant hurdles, including CNS accessibility and tolerability, as well as expensive manufacturing costs. Continued research of chemistries that enhance the cellular uptake, potency and

selectivity of action will substantially increase the clinical impact of RNA-based therapies in the treatment of DM and other toxic RNA diseases.

## 8. Conclusion

The diversity of DM1 animal models strongly contributed to clarifying the disease mechanisms mediated by toxic RNA molecules. The DM paradigm of RNA toxicity contributed to understand the molecular pathogenesis of other repeat expansion disorders, which share the typical accumulation of toxic transcripts in ribonuclear foci. The downstream pathogenesis is usually mediated by abnormal interaction of toxic RNA molecules with RNA-binding proteins, resulting in dysregulation of RNA metabolism, and in particular alternative splicing. Animal models were developed by independent laboratories and paved the way to the dissection of disease-causing mechanisms mediated by missplicing events. Today, these lines continue to refine our understanding of disease pathogenesis, providing substantial evidence that DM mechanisms are not limited to spliceopathy. In fact, abnormal gene expression, protein translation, RNA localisation and miRNA metabolism are likely involved, not only in DM but also in other toxic RNA diseases. The clear characterisation of the pathogenic events from disease mutation to clinical manifestations, and their phenotypic implications in DM has been paramount to develop rational and efficient molecular therapies. The vast collection of animal models of RNA toxicity currently available has accelerated research progress towards a solid understanding of disease biology, and provided valuable tools for the pre-clinical assessment of future therapies.

## Acknowledgements

We would like to thank Dr. Geneviève Gourdon and Dr. Laura Kennedy for helpful comments and discussion. Because of space constraints, we were unable to include the pertinent work of many authors and colleagues in this review. Our work is supported by grants from the AFM (Association Française contre les Myopathies, France), ANR (Agence Nationale de Recherche, France), INSERM (Institut National de la Santé et Recherche Médicale, France) and Université Paris Descartes (Paris, France). GS is funded by a PhD fellowship from the French Ministry for Higher Education and Research and AFM.

## References

- [1] I. Oberle, F. Rousseau, D. Heitz, C. Kretz, D. Devys, A. Hanauer, J. Boue, M.F. Bertheas, J.L. Mandel, Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome, *Science* 252 (1991) 1097–1102.
- [2] E.J. Kremer, M. Pritchard, M. Lynch, S. Yu, K. Holman, E. Baker, S.T. Warren, D. Schlessinger, G.R. Sutherland, R.I. Richards, Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)<sub>n</sub>, *Science* 252 (1991) 1711–1714.
- [3] S. Yu, M. Pritchard, E. Kremer, M. Lynch, J. Nancarrow, E. Baker, K. Holman, J.C. Mulley, S.T. Warren, D. Schlessinger, G.R. Sutherland, R.I. Richards, Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA, *Science* 252 (1991) 1179–1181.
- [4] A.J. Verkerk, M. Pieretti, J.S. Sutcliffe, Y.H. Fu, D.P. Kuhl, A. Pizzuti, O. Reiner, S. Richards, M.F. Victoria, F. Zhang, B.E. Eussen, G.-J.B. van Ommen, L.A.J. Blonden, G.J. Riggins, J.L. Chastain, C.B. Kunst, H. Galjaard, C.T. Caskey, D.L. Nelson, B.A. Oostra, S.T. Warren, Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome, *Cell* 65 (1991) 905–914.
- [5] A.R. La Spada, E.M. Wilson, D.B. Lubahn, A.E. Harding, K.H. Fischbeck, Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy, *Nature* 352 (1991) 77–79.
- [6] C.E. Pearson, K. Nichol Edamura, J.D. Cleary, Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations, *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005) 729–742.
- [7] M. Gomes-Pereira, D.G. Monckton, Chemical modifiers of unstable expanded simple sequence repeats: what goes up, could come down, *Mutat. Res.* 598 (2006) 15–34.
- [8] J.R. Gatchel, H.Y. Zoghbi, Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles, *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005) 743–755.

- [9] A. Lopez Castel, J.D. Cleary, C.E. Pearson, Repeat instability as the basis for human diseases and as a potential target for therapy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2010) 165–170.
- [10] C.T. McMurray, Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development, *Nat. Rev. Genet.* 11 (2010) 786–799.
- [11] T. Takahashi, S. Katada, O. Onodera, Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going? *J. Mol. Cell Biol.* 2 (2010) 180–191.
- [12] N. Sakamoto, P.D. Chastain, P. Parniewski, K. Ohshima, M. Pandolfo, J.D. Griffith, R.D. Wells, Sticky DNA: self-association properties of long GAA/ATC repeats in R.R.Y triplex structures from Friedreich's ataxia, *Mol. Cell* 3 (1999) 465–475.
- [13] M. Pieretti, F.P. Zhang, Y.H. Fu, S.T. Warren, B.A. Oostra, C.T. Caskey, D.L. Nelson, Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome, *Cell* 66 (1991) 817–822.
- [14] M. Gomes-Pereira, L. Foiry, G. Gourdon, Transgenic mouse models of unstable trinucleotide repeats, in: R.D. Wells, T. Ashizawa (Eds.), *Genetic Instabilities and Neurological Diseases*, Elsevier, San Diego, 2006, pp. 563–583.
- [15] J.D. Brook, M.E. McCurrach, H.G. Harley, A.J. Buckler, D. Church, H. Aburatani, K. Hunter, V.P. Stanton, J.P. Thirion, T. Hudson, R. Sohn, B. Zemelman, R.G. Snell, S.A. Rundle, S. Crow, J. Davies, P. Shelbourne, J. Buxton, C. Jones, V. Juvonen, K. Johnson, P.S. Harper, D.J. Shaw, D.E. Housman, 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.
- [16] Y.H. Fu, A. Pizzuti, R.G. Fenwick Jr., J. King, S. Rajnarayan, P.W. Dunne, J. Dubel, G.A. Nasser, T. Ashizawa, P. de Jong, B. Wieringa, R. Korneluk, M.B. Perryman, H.F. Epstein, C.T. Caskey, An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy, *Science* 255 (1992) 1256–1258.
- [17] M. Mahadevan, C. Tsilifidis, L. Sabourin, G. Shutter, C. Amemiya, G. Jansen, C. Neville, M. Narang, J. Barcelo, K. O'Hoy, S. Leblond, J. Earle-Macdonald, P.J. de Jong, B. Wieringa, R.G. Korneluk, Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene, *Science* 255 (1992) 1253–1255.
- [18] D.G. Monckton, M.I. Coolbaugh, K.T. Ashizawa, M.J. Siciliano, C.T. Caskey, Hypermutable myotonic dystrophy CTG repeats in transgenic mice, *Nat. Genet.* 15 (1997) 193–196.
- [19] G. Gourdon, F. Radvanyi, A.S. Lia, C. Duros, M. Blanche, M. Abitbol, C. Junien, H. Hofmann-Radvanyi, Moderate intergenerational and somatic instability of a 55-CTG repeat in transgenic mice, *Nat. Genet.* 15 (1997) 190–192.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] L.P. Ranum, T.A. Cooper, RNA-mediated neuromuscular disorders, *Annu. Rev. Neurosci.* 29 (2006) 259–277.
- [23] G. Sicot, G. Gourdon, M. Gomes-Pereira, Myotonic dystrophy, when simple repeats reveal complex pathogenic entities: new findings and future challenges, *Hum. Mol. Genet.* 20 (2011) R116–R123.
- [24] C.L. Liquori, 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] P.J. Hagerman, R.J. Hagerman, The fragile-X premutation: a maturing perspective, *Am. J. Hum. Genet.* 74 (2004) 805–816.
- [26] R.S. Daughters, D.L. Tuttle, W. Gao, Y. Ikeda, M.L. Moseley, T.J. Ebner, M.S. Swanson, L.P. Ranum, RNA gain-of-function in spinocerebellar ataxia type 8, *PLoS Genet.* 5 (2009) e1000600.
- [27] M.C. White, R. Gao, W. Xu, S.M. Mandal, J.G. Lim, T.K. Hazra, M. Wakamiya, S.F. Edwards, S. Raskin, H.A. Teive, H.Y. Zoghbi, P.S. Sarkar, T. Ashizawa, Inactivation of hnRNP K by expanded intronic AUUCU repeat induces apoptosis via translocation of PKCdelta to mitochondria in spinocerebellar ataxia 10, *PLoS Genet.* 6 (2010) e1000984.
- [28] S.E. Holmes, E.O. Hearn, C.A. Ross, R.L. Margolis, SCA12: an unusual mutation leads to an unusual spinocerebellar ataxia, *Brain Res. Bull.* 56 (2001) 397–403.
- [29] N. Sato, T. Amino, K. Kobayashi, S. Asakawa, T. Ishiguro, T. Tsunemi, M. Takahashi, T. Matsuura, K.M. Flanigan, S. Iwasaki, F. Ishino, Y. Saito, S. Murayama, M. Yoshida, Y. Hashizume, Y. Takahashi, S. Tsuji, N. Shimizu, T. Toda, K. Ishikawa, H. Mizusawa, Spinocerebellar ataxia type 31 is associated with "inserted" penta-nucleotide repeats containing (TGGAA)<sub>n</sub>, *Am. J. Hum. Genet.* 85 (2009) 544–557.
- [30] H. Kobayashi, K. Abe, T. Matsuura, Y. Ikeda, T. Hitomi, Y. Akechi, T. Habu, W. Liu, H. Okuda, A. Koizumi, Expansion of intronic GGCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement, *Am. J. Hum. Genet.* 89 (2011) 121–130.
- [31] D.D. Rudnicki, S.E. Holmes, M.W. Lin, C.A. Thornton, C.A. Ross, R.L. Margolis, Huntington's disease-like 2 is associated with CUG repeat-containing RNA foci, *Ann. Neurol.* 61 (2007) 272–282.
- [32] M. DeJesus-Hernandez, I.R. Mackenzie, B.F. Boeve, A.L. Boxer, M. Baker, N.J. Rutherford, A.M. Nicholson, N.A. Finch, H. Flynn, J. Adamson, N. Kouri, A. Wojtas, P. Sengdy, G.Y. Hsiung, A. Karydas, W.W. Seeley, K.A. Josephs, G. Coppola, D.H. Geschwind, Z.K. Wszolek, H. Feldman, D.S. Knopman, R.C. Petersen, B.L. Miller, D.W. Dickson, K.B. Boylan, N.R. Graff-Radford, R. Rademakers, Expanded GGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS, *Neuron* 72 (2011) 245–256.
- [33] M. Wojciechowska, W.J. Krzyzosiak, CAG repeat RNA as an auxiliary toxic agent in polyglutamine disorders, *RNA Biol.* 8 (2011) 565–571.
- [34] S.A. Mulders, W.J. van den Broek, T.M. Wheeler, H.J. Croes, P. van Kuik-Romeijn, S.J. de Kimpfe, 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.
- [35] 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.
- [36] T.M. Wheeler, A.J. Leger, S.K. Pandey, A.R. MacLeod, M. Nakamori, S.H. Cheng, B.M. Wentworth, C.F. Bennett, C.A. Thornton, Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy, *Nature* 488 (2012) 111–115.
- [37] J.E. Lee, C.F. Bennett, T.A. Cooper, RNase H-mediated degradation of toxic RNA in myotonic dystrophy type 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 4221–4226.
- [38] A. Garcia-Lopez, B. Llamusi, M. Orzae, E. Perez-Paya, R.D. Artero, In vivo discovery of a peptide that prevents CUG-RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 11866–11871.
- [39] P.S. Harper, *Myotonic Dystrophy*, 3rd ed. WB Saunders, 2001.
- [40] C.A. Boucher, S.K. King, N. Carey, R. Krahe, C.L. Winchester, S. Rahman, T. Creavin, P. Meghji, M.E. Bailey, F.L. Chartier, S.D. Brown, M.J. Siciliano, K.J. Johnson, A novel homeodomain-encoding gene is associated with a large CpG island interrupted by the myotonic dystrophy unstable (CTG)<sub>n</sub> repeat, *Hum. Mol. Genet.* 4 (1995) 1919–1925.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] J.W. Miller, C.R. Urbinati, P. Teng-Ummuay, M.G. Stenberg, B.J. Byrne, C.A. Thornton, M.S. Swanson, Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)<sub>n</sub> expansions associated with myotonic dystrophy, *EMBO J.* 19 (2000) 4439–4448.
- [44] M. Fardaei, M.T. Rogers, H.M. Thorpe, K. Larkin, M.G. Hamshere, P.S. Harper, J.D. Brook, Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 805–814.
- [45] M. Fardaei, K. Larkin, J.D. Brook, M.G. Hamshere, In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 2766–2771.
- [46] L.T. Timchenko, N.A. Timchenko, C.T. Caskey, R. Roberts, Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy, *Hum. Mol. Genet.* 5 (1996) 115–121.
- [47] N.A. Timchenko, Z.J. Cai, A.L. Welms, 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.
- [48] 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.
- [49] 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.
- [50] R.S. Savkur, A.V. Philips, T.A. Cooper, J.C. Dalton, M.L. Moseley, L.P. Ranum, J.W. Day, Insulin receptor splicing alteration in myotonic dystrophy type 2, *Am. J. Hum. Genet.* 74 (2004) 1309–1313.
- [51] 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.
- [52] R. Pelletier, F. Hamel, D. Beaulieu, L. Patry, C. Haieault, M. Tarnopolsky, B. Schoser, J. Puymirat, Absence of a differentiation defect in muscle satellite cells from DM2 patients, *Neurobiol. Dis.* 36 (2009) 181–190.
- [53] E. Salisbury, B. Schoser, C. Schneider-Gold, G.L. Wang, C. Huichalaf, B. Jin, M. Siroto, P. Sarkar, R. Krahe, N.A. Timchenko, L.T. Timchenko, Expression of RNA CCUG repeats dysregulates translation and degradation of proteins in myotonic dystrophy 2 patients, *Am. J. Pathol.* 175 (2009) 748–762.
- [54] 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.
- [55] 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.
- [56] K. Jones, C. Wei, P. Iakova, E. Bugiardini, C. Schneider-Gold, G. Meola, J. Woodgett, J. Killian, N.A. Timchenko, L.T. Timchenko, GSK3beta mediates muscle pathology in myotonic dystrophy, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 4461–4472.
- [57] C. Guiraud-Dogan, A. Huguot, M. Gomes-Pereira, E. Brisson, G. Bassez, C. Junien, G. Gourdon, DM1 CTG expansions affect insulin receptor isoforms expression in various tissues of transgenic mice, *Biochim. Biophys. Acta* 1772 (2007) 1183–1191.
- [58] M. Gomes-Pereira, L. Foiry, A. Nicole, A. Huguot, C. Junien, A. Munnich, G. Gourdon, CTG trinucleotide repeat "big jumps": large expansions, small mice, *PLoS Genet.* 3 (2007) e52.
- [59] A. Huguot, F. Medja, A. Nicole, A. Vignaud, A. Ferry, C. Guiraud-Dogan, V. Decostre, J.-Y. Hogrel, F. Metzger, A. Hoefflich, E. Mouisel, M. Gomes-Pereira, G. Bassez, J. Puymirat, D. Furling, A. Munnich, G. Gourdon, Molecular, physiological

- and motor performance defects in DMSXL mice carrying >1000 CTG repeat from the human DM1 locus, *PLoS Genet.* 8 (2012) e1003043.
- [60] O. Hernandez-Hernandez, C. Guiraud-Dogan, G. Sicot, A. Huguet, S. Lullier, E. Steidl, S. Saenger, E. Marciniak, H. Obriot, C. Chevarin, A. Nicole, L. Revillod, K. Charizanis, K.Y. Lee, Y. Suzuki, T. Kimura, T. Matsuura, B. Cisneros, M.S. Swanson, F. Trovero, B. Buisson, J.C. Bizot, M. Hamon, S. Humez, G. Bassez, F. Metzger, L. Buee, A. Munnich, N. Sergeant, G. Gourdon, M. Gomes-Pereira, Myotonic dystrophy CTG expansion affects synaptic vesicle proteins, neurotransmission and mouse behaviour, *Brain* (2013), <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awt1367>.
- [61] G.S. Wang, D.L. Kearney, M. De Biasi, G. Taffet, T.A. Cooper, Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 2802–2811.
- [62] 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.
- [63] 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.
- [64] J.D. Amack, M.S. Mahadevan, The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 1879–1887.
- [65] K. Jones, B. Jin, P. Iakova, C. Huichalaf, P. Sarkar, C. Schneider-Gold, B. Schoser, G. Meola, A.B. Shyu, N. Timchenko, L. Timchenko, RNA Foci, CUGBP1, and ZNF9 are the primary targets of the mutant CUG and CCG repeats expanded in myotonic dystrophies type 1 and type 2, *Am. J. Pathol.* 179 (2011) 2475–2489.
- [66] M. Gomes-Pereira, T.A. Cooper, G. Gourdon, Myotonic dystrophy mouse models: towards rational therapy development, *Trends Mol. Med.* 17 (2011) 506–517.
- [67] J.M. Houseley, Z. Wang, G.J. Brock, J. Soloway, R. Artero, M. Perez-Alonso, K.M. O'Dell, D.G. Monckton, Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 873–883.
- [68] M. de Haro, I. Al-Ramahi, B. De Gouyon, L. Ukani, A. Rosa, N.A. Faustino, T. Ashizawa, T.A. Cooper, J. Botas, MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 2138–2145.
- [69] 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.
- [70] G. Le Mee, N. Ezzeddine, M. Capri, O. Ait-Ahmed, Repeat length and RNA expression levels are not primary determinants in CUG expansion toxicity in *Drosophila* models, *PLoS One* 3 (2008) e1466.
- [71] K.Y. Chen, H. Pan, M.J. Lin, Y.Y. Li, L.C. Wang, Y.C. Wu, K.M. Hsiao, Length-dependent toxicity of untranslated CUG repeats on *Caenorhabditis elegans*, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 352 (2007) 774–779.
- [72] C. Braidia, R.K. Stefanatos, B. Adam, N. Mahajan, H.J. Smeets, F. Niel, C. Goizet, B. Arveiler, M. Koenig, C. Lagier-Tourenne, J.L. Mandel, C.G. Faber, C.E. de Die-Smulders, F. Spaans, D.G. Monckton, Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational dynamics and likely contribute toward unusual symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients, *Hum. Mol. Genet.* 19 (2010) 1399–1412.
- [73] Z. Musova, R. Mazanec, A. Krepelova, E. Ehler, J. Vales, R. Jaklova, T. Prochazka, P. Koukal, T. Marikova, J. Kraus, M. Havlovicova, Z. Sedlacek, Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene, *Am. J. Med. Genet. A* 149A (2009) 1365–1374.
- [74] 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.
- [75] R.D. Wells, P. Parmiewski, A. Pluciennik, A. Bacolla, R. Gellibolian, A. Jaworski, Small slipped register genetic instabilities in *Escherichia coli* in triplet repeat sequences associated with hereditary neurological diseases, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 19532–19541.
- [76] H. Seznec, A.S. Lia-Baldini, C. Duros, C. Fouquet, C. Lacroix, H. Hofmann-Radvanyi, C. Junien, G. Gourdon, Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 1185–1194.
- [77] P.S. Sarkar, H.C. Chang, F.B. Boudi, S. Reddy, CTG repeats show bimodal amplification in *E. coli*, *Cell* 95 (1998) 531–540.
- [78] R.J. Osborne, C.A. Thornton, Cell-free cloning of highly expanded CTG repeats by amplification of dimerized expanded repeats, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) e24.
- [79] 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.
- [80] K. Suenaga, K.Y. Lee, M. Nakamori, Y. Tatsumi, M.P. Takahashi, H. Fujimura, K. Jinnai, H. Yoshikawa, H. Du, M. Ares Jr., M.S. Swanson, T. Kimura, Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain, *PLoS One* 7 (2012) e33218.
- [81] A. Matynia, C.H. Ng, W. Dansithong, A. Chiang, A.J. Silva, S. Reddy, 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 (2010) e9857.
- [82] R. Artero, A. Prokop, N. Paricio, G. Begemann, I. Pueyo, M. Mlodzik, M. Perez-Alonso, M.K. Baylies, The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2, *Dev. Biol.* 195 (1998) 131–143.
- [83] L. Machuca-Tzili, H. Thorpe, T.E. Robinson, C. Sewry, J.D. Brook, Flies deficient in Muscleblind protein model features of myotonic dystrophy with altered splice forms of Z-band associated transcripts, *Hum. Genet.* 120 (2006) 487–499.
- [84] K.A. Spilker, G.J. Wang, M.S. Tugizova, K. Shen, *Caenorhabditis elegans* muscleblind homolog mbl-1 functions in neurons to regulate synapse formation, *Neural Dev.* 7 (2012) 7.
- [85] 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.
- [86] M. Hao, K. Akrami, K. Wei, C. De Diego, N. Che, J.H. Ku, J. Tidball, M.C. Graves, P.B. Shieh, F. Chen, Muscleblind-like 2 (Mbnl2) -deficient mice as a model for myotonic dystrophy, *Dev. Dyn.* 237 (2008) 403–410.
- [87] K. Charizanis, K.Y. Lee, R. Batra, M. Goodwin, C. Zhang, Y. Yuan, L. Shue, M. Cline, M.M. Scotti, G. Xia, A. Kumar, T. Ashizawa, H.B. Clark, T. Kimura, M.P. Takahashi, H. Fujimura, K. Jinnai, H. Yoshikawa, M. Gomes-Pereira, G. Gourdon, N. Sakai, S. Nishino, T.C. Foster, M. Ares Jr., R.B. Darnell, M.S. Swanson, Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy, *Neuron* 75 (2012) 437–450.
- [88] L.E. Machuca-Tzili, S. Buxton, A. Thorpe, C.M. Timson, P. Wigmore, P.K. Luther, J.D. Brook, Zebrafish deficient for muscleblind-like 2 exhibit features of myotonic dystrophy, *Dis. Model. Mech.* 4 (2011) 381–392.
- [89] R.N. Kanadia, C.R. Urbinati, V.J. Crusselle, D. Luo, Y.J. Lee, J.K. Harrison, S.P. Oh, M.S. Swanson, Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3, *Gene Expr. Patterns* 3 (2003) 459–462.
- [90] K.S. Lee, Y. Cao, H.E. Witwicka, S. Tom, S.J. Tapscott, E.H. Wang, RNA-binding protein Muscleblind-like 3 (MBNL3) disrupts myocyte enhancer factor 2 (Mef2) [beta]-exon splicing, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 33779–33787.
- [91] N.A. Timchenko, R. Patel, P. Iakova, J.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.
- [92] T.H. Ho, D. Bundman, D.L. Armstrong, T.A. Cooper, Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 1539–1547.
- [93] 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.
- [94] 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.
- [95] C.M. Dhaenens, H. Tran, M.L. Frandemiche, C. Carpentier, S. Schraen-Maschke, A. Sistiaga, M. Goicoechea, S. Eddarkaoui, E. Van Brussels, H. Obriot, A. Labudeck, M.H. Gevaert, F. Fernandez-Gomez, N. Charlet-Berguerand, V. Deramecourt, C.A. Muraige, L. Buee, A.L. de Munain, B. Sablonniere, M.L. Caillet-Boudin, N. Sergeant, Mis-splicing of Tau exon 10 in myotonic dystrophy type 1 is reproduced by overexpression of CELF2 but not by MBNL1 silencing, *Biochim. Biophys. Acta* 1812 (2011) 732–742.
- [96] 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.
- [97] 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.
- [98] J.D. Lueck, C. Lungu, A. Mankodi, R.J. Osborne, S.L. Welle, R.T. Dirksen, C.A. Thornton, Chloride channelopathy in myotonic dystrophy resulting from loss of posttranscriptional regulation for CLCN1, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292 (2007) C1291–C1297.
- [99] J.D. Lueck, A. Mankodi, M.S. Swanson, C.A. Thornton, R.T. Dirksen, Muscle chloride channel dysfunction in two mouse models of myotonic dystrophy, *J. Gen. Physiol.* 129 (2007) 79–94.
- [100] 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.
- [101] J.P. Orengo, A.J. Ward, T.A. Cooper, Alternative splicing dysregulation secondary to skeletal muscle regeneration, *Ann. Neurol.* 69 (2011) 681–690.
- [102] A. Botta, L. Vallo, F. Rinaldi, E. Bonifazi, F. Amati, M. Biancolella, S. Gambardella, E. Mancinelli, C. Angelini, G. Meola, G. Novelli, Gene expression analysis in myotonic dystrophy: indications for a common molecular pathogenic pathway in DM1 and DM2, *Gene Expr.* 13 (2007) 339–351.
- [103] A. Vihola, L.L. Bachinski, M. Siritto, S.E. Olufemi, S. Hajibashi, K.A. Baggerly, O. Raheem, H. Haapasalo, T. Suominen, J. Holmlund-Hampf, A. Paetau, R. Cardani, G. Meola, H. Kalimo, L. Edstrom, R. Krahe, B. Udd, Differences in aberrant expression and splicing of sarcomeric proteins in the myotonic dystrophies DM1 and DM2, *Acta Neuropathol.* 119 (2010) 465–479.
- [104] A. Vihola, M. Siritto, L.L. Bachinski, O. Raheem, M. Screen, T. Suominen, R. Krahe, B. Udd, Altered expression and splicing of Ca<sup>2+</sup> metabolism genes in myotonic dystrophies DM1 and DM2, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01289.x>.
- [105] H. Du, M.S. Cline, R.J. Osborne, D.L. Tuttle, T.A. Clark, J.P. Donohue, M.P. Hall, L. Shue, 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.
- [106] A. Masuda, H.S. Andersen, T.K. Doktor, T. Okamoto, M. Ito, B.S. Andresen, K. Ohno, CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay, *Sci. Rep.* 2 (2012) 209.
- [107] 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. Aubouef, 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.



- [108] 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.
- [109] 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.
- [110] S. Greco, A. Perfetti, P. Fasanaro, R. Cardani, M.C. Capogrossi, G. Meola, F. Martelli, Deregulated microRNAs in myotonic dystrophy type 2, *PLoS One* 7 (2012) e39732.
- [111] J.M. Fernandez-Costa, A. Garcia-Lopez, S. Zuniga, V. Fernandez-Pedrosa, A. Felipo-Benavent, M. Mata, O. Jaka, A. Aiastui, F. Hernandez-Torres, B. Aguado, M. Perez-Alonso, J.J. Vilchez, A. Lopez de Munain, R.D. Artero, Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in *Drosophila* that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients, *Hum. Mol. Genet.* 22 (2012) 704–716.
- [112] N.A. Timchenko, P. Iakova, Z.J. Cai, J.R. Smith, L.T. Timchenko, Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 6927–6938.
- [113] E.T. Wang, N.A. Cody, S. Jog, M. Biancolella, T.T. Wang, D.J. Treacy, S. Luo, G.P. Schroth, D.E. Housman, S. Reddy, E. Lecuyer, C.B. Burge, Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins, *Cell* 150 (2012) 710–724.
- [114] Y. Adereth, V. Dammai, N. Kose, R. Li, T. Hsu, RNA-dependent integrin alpha3 protein localization regulated by the Muscleblind-like protein MLP1, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 1240–1247.
- [115] S. Paul, W. Dansithong, D. Kim, J. Rossi, N.J. Webster, L. Comai, S. Reddy, Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing, *EMBO J.* 25 (2006) 4271–4283.
- [116] W. Dansithong, S.P. Jog, S. Paul, R. Mohammadzadeh, S. Tring, Y. Kwok, R.C. Fry, P. Marjoram, L. Comai, S. Reddy, RNA steady-state defects in myotonic dystrophy are linked to nuclear exclusion of SHARP, *EMBO Rep.* 12 (2011) 735–742.
- [117] F.X. Laurent, A. Sureau, A.F. Klein, F. Trouslard, E. Gasnier, D. Furling, J. Marie, New function for the RNA helicase p68/DDX5 as a modifier of MBNL1 activity on expanded CUG repeats, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 3159–3171.
- [118] A. Ebralidze, Y. Wang, V. Petkova, K. Ebralidse, R.P. Jungmans, RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy, *Science* 303 (2004) 383–387.
- [119] 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.
- [120] B. Llamusi, A. Bargiela, J.M. Fernandez-Costa, A. Garcia-Lopez, R. Klima, F. Feiguin, R. Artero, Muscleblind, BSF and TBPH are mislocalized in the muscle sarcomere of a *Drosophila* myotonic dystrophy model, *Dis. Model Mech.* 6 (2013) 184–196.
- [121] A. Garcia-Lopez, L. Monferrer, I. Garcia-Alcover, M. Vicente-Crespo, M.C. Alvarez-Abril, R.D. Artero, Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in *Drosophila*, *PLoS One* 3 (2008) e1595.
- [122] 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.
- [123] R. Batra, K. Charizanis, M.S. Swanson, Partners in crime: bidirectional transcription in unstable microsatellite disease, *Hum. Mol. Genet.* 19 (2010) R77–R82.
- [124] G.N. Filippova, C.P. Thienes, B.H. Penn, D.H. Cho, Y.J. Hu, J.M. Moore, T.R. Klesert, V.V. Lobanenko, S.J. Tapscott, CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus, *Nat. Genet.* 28 (2001) 335–343.
- [125] V. Dion, J.H. Wilson, Instability and chromatin structure of expanded trinucleotide repeats, *Trends Genet.* 25 (2009) 288–297.
- [126] A.R. La Spada, J.P. Taylor, Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis, *Nat. Rev. Genet.* 11 (2010) 247–258.
- [127] B.L. Sopher, P.D. Ladd, V.V. Pineda, R.T. Libby, S.M. Sunkin, J.B. Hurlley, C.P. Thienes, T. Gaasterland, G.N. Filippova, A.R. La Spada, CTCF regulates Ataxin-7 expression through promotion of a convergently transcribed, antisense noncoding RNA, *Neuron* 70 (2011) 1071–1084.
- [128] 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.
- [129] T.H. Ho, R.S. Savkur, M.G. Poulos, M.A. Mancini, M.S. Swanson, T.A. Cooper, Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 2923–2933.
- [130] A. Mykowska, K. Sobczak, M. Wojciechowska, P. Kozlowski, W.J. Krzyzosiak, CAG repeats mimic CUG repeats in the misregulation of alternative splicing, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 8938–8951.
- [131] K.T. Lawlor, L.V. O'Keefe, S.E. Samaraweera, C.L. van Eyk, C.J. McLeod, C.A. Maloney, T.H. Dang, C.M. Suter, R.I. Richards, Double-stranded RNA is pathogenic in *Drosophila* models of expanded repeat neurodegenerative diseases, *Hum. Mol. Genet.* 20 (2011) 3757–3768.
- [132] K.T. Lawlor, L.V. O'Keefe, S.E. Samaraweera, C.L. van Eyk, R.I. Richards, Ubiquitous expression of CUG or CAG trinucleotide repeat RNA causes common morphological defects in a *Drosophila* model of RNA-mediated pathology, *PLoS One* 7 (2012) e38516.
- [133] 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.
- [134] 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.
- [135] R.I. Richards, K. Holman, H. Kozman, E. Kremer, M. Lynch, M. Pritchard, S. Yu, J. Mulley, G.R. Sutherland, Fragile X syndrome: genetic localisation by linkage mapping of two microsatellite repeats FRAXAC1 and FRAXAC2 which immediately flank the fragile site, *J. Med. Genet.* 28 (1991) 818–823.
- [136] J.R. Brouwer, R. Willemsen, B.A. Oostra, The FMR1 gene and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 150B (2008) 782–798.
- [137] F. Tassone, R.J. Hagerman, A.K. Taylor, L.W. Gane, T.E. Godfrey, P.J. Hagerman, Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome, *Am. J. Hum. Genet.* 66 (2000) 6–15.
- [138] C.M. Greco, R.J. Hagerman, F. Tassone, A.E. Chudley, M.R. Del Bigio, S. Jacquemont, M. Leehy, P.J. Hagerman, Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers, *Brain* 125 (2002) 1760–1771.
- [139] F. Tassone, C. Iwahashi, P.J. Hagerman, FMR1 RNA within the intranuclear inclusions of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS), *RNA Biol.* 1 (2004) 103–105.
- [140] P. Jin, D.C. Zarnescu, F. Zhang, C.E. Pearson, J.C. Lucchesi, K. Moses, S.T. Warren, RNA-mediated neurodegeneration caused by the fragile X premutation rCGG repeats in *Drosophila*, *Neuron* 39 (2003) 739–747.
- [141] V. Hashem, J.N. Galloway, M. Mori, R. Willemsen, B.A. Oostra, R. Paylor, D.L. Nelson, Ectopic expression of CGG containing mRNA is neurotoxic in mammals, *Hum. Mol. Genet.* 18 (2009) 2443–2451.
- [142] D. Van Dam, V. Errigiers, R.F. Kooy, R. Willemsen, E. Mientjes, B.A. Oostra, P.P. De Deyn, Cognitive decline, neuromotor and behavioural disturbances in a mouse model for fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS), *Behav. Brain Res.* 162 (2005) 233–239.
- [143] R. Willemsen, M. Hoogeveen-Westerveld, S. Reis, J. Holstege, L.A. Severijnen, I.M. Nieuwenhuizen, M. Schrier, L. van Unen, F. Tassone, A.T. Hoogeveen, P.J. Hagerman, E.J. Mientjes, B.A. Oostra, The FMR1 CGG repeat mouse displays ubiquitin-positive intranuclear neuronal inclusions; implications for the cerebellar tremor/ataxia syndrome, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 949–959.
- [144] P. Jin, R. Duan, A. Qurashi, Y. Qin, D. Tian, T.C. Rosser, H. Liu, Y. Feng, S.T. Warren, Pur alpha binds to rCGG repeats and modulates repeat-mediated neurodegeneration in a *Drosophila* model of fragile X tremor/ataxia syndrome, *Neuron* 55 (2007) 556–564.
- [145] K. Khalili, L. Del Valle, V. Muralidharan, W.J. Gault, N. Darbinian, J. Otte, E. Meier, E.M. Johnson, D.C. Daniel, Y. Kinoshita, S. Amini, J. Gordon, Puralpha is essential for postnatal brain development and developmentally coupled cellular proliferation as revealed by genetic inactivation in the mouse, *Mol. Cell Biol.* 23 (2003) 6857–6875.
- [146] O.A. Sofola, P. Jin, Y. Qin, R. Duan, H. Liu, M. de Haro, D.L. Nelson, J. Botas, RNA-binding proteins hnRNP A2/B1 and CUGBP1 suppress fragile X CGG premutation repeat-induced neurodegeneration in a *Drosophila* model of FXTAS, *Neuron* 55 (2007) 565–571.
- [147] P.K. Todd, S.Y. Oh, A. Krans, U.B. Pandey, N.A. Di Prospero, K.T. Min, J.P. Taylor, H.L. Paulson, Histone deacetylases suppress CGG repeat-induced neurodegeneration via transcriptional silencing in models of fragile X tremor ataxia syndrome, *PLoS Genet.* 6 (2010) e1001240.
- [148] C.K. Iwahashi, D.H. Yasui, H.J. An, C.M. Greco, F. Tassone, K. Nannen, B. Babineau, C.B. Lebrilla, R.J. Hagerman, P.J. Hagerman, Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS, *Brain* 129 (2006) 256–271.
- [149] C. Sellier, F. Rau, Y. Liu, F. Tassone, R.K. Hukema, R. Gattoni, A. Schneider, S. Richard, R. Willemsen, D.J. Elliott, P.J. Hagerman, N. Charlet-Berguerand, Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients, *EMBO J.* 29 (2010) 1248–1261.
- [150] O.A. Sofola, P. Jin, J. Botas, D.L. Nelson, Argonaute-2-dependent rescue of a *Drosophila* model of FXTAS by FRAXE premutation repeat, *Hum. Mol. Genet.* 16 (2007) 2326–2332.
- [151] Y. Ikeda, R.S. Daughters, L.P. Ranum, Bidirectional expression of the SCA8 expansion mutation: one mutation, two genes, *Cerebellum* 7 (2008) 150–158.
- [152] M. Mutsuddi, C.M. Marshall, K.A. Benzow, M.D. Koob, I. Rebay, The spinocerebellar ataxia 8 noncoding RNA causes neurodegeneration and associates with staufen in *Drosophila*, *Curr. Biol.* 14 (2004) 302–308.
- [153] M.L. Moseley, T. Zu, Y. Ikeda, W. Gao, A.K. Mosemiller, R.S. Daughters, G. Chen, M.R. Weatherspoon, H.B. Clark, T.J. Ebner, J.W. Day, L.P. Ranum, Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8, *Nat. Genet.* 38 (2006) 758–769.
- [154] T. Zu, B. Gibbins, N.S. Doty, M. Gomes-Pereira, A. Huguet, 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 (2011) 260–265.
- [155] R.L. Margolis, E. O'Hearn, A. Rosenblatt, V. Willour, S.E. Holmes, M.L. Franz, C. Callahan, H.S. Hwang, J.C. Troncoso, C.A. Ross, A disorder similar to Huntington's disease is associated with a novel CAG repeat expansion, *Ann. Neurol.* 50 (2001) 373–380.
- [156] S.E. Holmes, E. O'Hearn, A. Rosenblatt, C. Callahan, H.S. Hwang, R.G. Ingersoll-Ashworth, A. Fleisher, G. Stevanin, A. Brice, N.T. Potter, C.A. Ross, R.L. Margolis, A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2, *Nat. Genet.* 29 (2001) 377–378.
- [157] B. Wilburn, D.D. Rudnicki, J. Zhao, T.M. Weitz, Y. Cheng, X. Gu, E. Greiner, C.S. Park, N. Wang, B.L. Sopher, A.R. La Spada, A. Osmand, R.L. Margolis, Y.E. Sun, X.W. Yang, An antisense CAG repeat transcript at JPH3 locus mediates expanded polyglutamine protein toxicity in Huntington's disease-like 2 mice, *Neuron* 70 (2011) 427–440.



- [158] A.I. Seixas, S.E. Holmes, H. Takeshima, A. Pavlovich, N. Sachs, J.L. Pruitt, I. Silveira, C.A. Ross, R.L. Margolis, D.D. Rudnicki, Loss of junctophilin-3 contributes to Huntington disease-like 2 pathogenesis, *Ann. Neurol.* 71 (2012) 245–257.
- [159] T. Matsura, T. Yamagata, D.L. Burgess, A. Rasmussen, R.P. Grewal, K. Watase, M. Khajavi, A.E. McCall, C.F. Davis, L. Zu, M. Achari, S.M. Pulst, E. Alonso, J.L. Noebels, D.L. Nelson, H.Y. Zoghbi, T. Ashizawa, Large expansion of the ATCTT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10, *Nat. Genet.* 26 (2000) 191–194.
- [160] H.A. Teive, R.P. Munhoz, W.O. Arruda, S. Raskin, L.C. Werneck, T. Ashizawa, Spinocerebellar ataxia type 10 – a review, *Parkinsonism Relat. Disord.* 17 (2011) 655–661.
- [161] M. White, G. Xia, R. Gao, M. Wakamiya, P.S. Sarkar, K. McFarland, T. Ashizawa, Transgenic mice with SCA10 pentanucleotide repeats show motor phenotype and susceptibility to seizure: a toxic RNA gain-of-function model, *J. Neurosci. Res.* 90 (2012) 706–714.
- [162] C.L. van Eyk, L.V. O'Keefe, K.T. Lawlor, S.E. Samaraweera, C.J. McLeod, G.R. Price, D.J. Venter, R.I. Richards, Perturbation of the Akt/Gsk3-beta signalling pathway is common to *Drosophila* expressing expanded untranslated CAG, CUG and AUUCU repeat RNAs, *Hum. Mol. Genet.* 20 (2011) 2783–2794.
- [163] S.E. Holmes, E. O'Hearn, R.L. Margolis, Why is SCA12 different from other SCAs? *Cytogenet. Genome Res.* 100 (2003) 189–197.
- [164] S.E. Holmes, E.E. O'Hearn, M.G. McInnis, D.A. Gorelick-Feldman, J.J. Kleiderlein, C. Callahan, N.G. Kwak, R.G. Ingersoll-Ashworth, M. Sherr, A.J. Sumner, A.H. Sharp, U. Ananth, W.K. Seltzer, M.A. Boss, A.M. Viera-Saecker, J.T. Epplen, O. Riess, C.A. Ross, R.L. Margolis, Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12, *Nat. Genet.* 23 (1999) 391–392.
- [165] C.H. Lin, C.M. Chen, Y.T. Hou, Y.R. Wu, H.M. Hsieh-Li, M.T. Su, G.J. Lee-Chen, The CAG repeat in SCA12 functions as a cis element to up-regulate PPP2R2B expression, *Hum. Genet.* 128 (2010) 205–212.
- [166] Y.C. Wang, C.M. Lee, L.C. Lee, L.C. Tung, H.M. Hsieh-Li, G.J. Lee-Chen, M.T. Su, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress contribute to the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 12 (SCA12), *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 21742–21754.
- [167] S. Sengupta, S.C. Lakhota, Altered expressions of the noncoding hsromega gene enhances poly-Q-induced neurotoxicity in *Drosophila*, *RNA Biol.* 3 (2006) 28–35.
- [168] D. Longman, I.L. Johnstone, J.F. Caceres, Functional characterization of SR and SR-related genes in *Caenorhabditis elegans*, *EMBO J.* 19 (2000) 1625–1637.
- [169] H.Z. Ring, J.T. Lis, The SR protein B52/SRP55 is essential for *Drosophila* development, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 7499–7506.
- [170] X. Xu, D. Yang, J.H. Ding, W. Wang, P.H. Chu, N.D. Dalton, H.Y. Wang, J.R. Birmingham Jr., Z. Ye, F. Liu, M.G. Rosenfeld, J.L. Manley, J. Ross Jr., J. Chen, R.P. Xiao, H. Cheng, X.D. Fu, ASF/SF2-regulated CaMKII $\delta$  alternative splicing temporally reprograms excitation–contraction coupling in cardiac muscle, *Cell* 120 (2005) 59–72.
- [171] Y. Ikeda, Y. Ohta, H. Kobayashi, M. Okamoto, K. Takamatsu, T. Ota, Y. Manabe, K. Okamoto, A. Koizumi, K. Abe, Clinical features of SCA36: a novel spinocerebellar ataxia with motor neuron involvement (Asidan), *Neurology* 79 (2012) 333–341.
- [172] R. Rademakers, M. Neumann, I.R. Mackenzie, Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia, *Nat. Rev. Neurol.* 8 (2012) 423–434.
- [173] A.E. Renton, E. Majounie, A. Waite, J. Simon-Sanchez, S. Rollinson, J.R. Gibbs, J.C. Schymick, H. Laaksovirta, J.C. van Swieten, L. Myllykangas, H. Kalimo, A. Paetau, Y. Abramzon, A.M. Remes, A. Kaganovich, S.W. Scholz, J. Duckworth, J. Ding, D.W. Harmer, D.G. Hernandez, J.O. Johnson, K. Mok, M. Ryten, D. Trabzuni, R.J. Guerreiro, R.W. Orrell, J. Neal, A. Murray, J. Pearson, I.E. Jansen, D. Sondervan, H. Seelaar, D. Blake, K. Young, N. Halliwell, J.B. Callister, G. Toulson, A. Richardson, A. Gerhard, J. Snowden, D. Mann, D. Neary, M.A. Nalls, T. Peuralinna, L. Jansson, V.M. Isoviiita, A.L. Kaivorinne, M. Holtta-Vuori, E. Ikonen, R. Sulkava, M. Benatar, J. Wu, A. Chio, G. Restagno, G. Borghero, M. Sabatelli, D. Heckerman, E. Rogava, L. Zinman, J.D. Rothstein, M. Sendtner, C. Drepper, E.E. Eichler, C. Alkan, Z. Abdullaev, S.D. Pack, A. Dutra, E. Pak, J. Hardy, A. Singleton, N.M. Williams, P. Heutink, S. Pickering-Brown, H.R. Morris, P.J. Tienari, B.J. Traynor, A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD, *Neuron* 72 (2011) 257–268.
- [174] Z. Yu, A.M. Wang, D.M. Robins, A.P. Lieberman, Altered RNA splicing contributes to skeletal muscle pathology in Kennedy disease knock-in mice, *Dis. Model. Mech.* 2 (2009) 500–507.
- [175] B. Brais, J.P. Bouchard, Y.G. Xie, D.L. Rochefort, N. Chretien, F.M. Tome, R.G. Lafreniere, J.M. Rommens, E. Uyama, O. Nohira, S. Blumen, A.D. Korczyn, P. Heutink, J. Mathieu, A. Duranceau, F. Codere, M. Fardeau, G.A. Rouleau, Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy, *Nat. Genet.* 18 (1998) 164–167.
- [176] L.P. Corbeil-Girard, A.F. Klein, A.M. Sasseville, H. Lavoie, M.J. Dicaire, A. Saint-Denis, M. Page, A. Duranceau, F. Codere, J.P. Bouchard, G. Karpati, G.A. Rouleau, B. Massie, Y. Langelier, B. Brais, PABPN1 overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions, *Neurobiol. Dis.* 18 (2005) 551–567.
- [177] H. Hino, K. Araki, E. Uyama, M. Takeya, M. Araki, K. Yoshinobu, K. Miike, Y. Kawazoe, Y. Maeda, M. Uchino, K. Yamamura, Myopathy phenotype in transgenic mice expressing mutated PABPN1 as a model of oculopharyngeal muscular dystrophy, *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 181–190.
- [178] M.S. Mahadevan, R.S. Yadava, Q. Yu, S. Balijepalli, C.D. Frenzel-McCardell, T.D. Bourne, L.H. Phillips, Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy, *Nat. Genet.* 38 (2006) 1066–1070.
- [179] W. Chen, Y. Wang, Y. Abe, L. Cheney, B. Udd, Y.P. Li, Haploinsufficiency for Znf9 in Znf9<sup>+/-</sup> mice is associated with multiorgan abnormalities resembling myotonic dystrophy, *J. Mol. Biol.* 368 (2007) 8–17.
- [180] 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.
- [181] A. Botta, S. Caldarola, L. Vallo, E. Bonifazi, D. Fruci, F. Gullotta, R. Massa, G. Novelli, F. Loreni, Effect of the [CTGTG]<sub>n</sub> repeat expansion on ZNF9 expression in myotonic dystrophy type II (DM2), *Biochim. Biophys. Acta* 1762 (2006) 329–334.
- [182] C. Huichalaf, B. Schoser, C. Schneider-Gold, B. Jin, P. Sarkar, L. Timchenko, Reduction of the rate of protein translation in patients with myotonic dystrophy 2, *J. Neurosci.* 29 (2009) 9042–9049.
- [183] O. Raheem, S.E. Olufemi, L.L. Bachinski, A. Vihola, M. Sirtio, J. Holmlund-Hampf, H. Haapasalo, Y.P. Li, B. Udd, R. Krahe, Mutant (CCTG)<sub>n</sub> expansion causes abnormal expression of zinc finger protein 9 in myotonic dystrophy type 2, *Am. J. Pathol.* 177 (2010) 3025–3036.
- [184] R. Krahe, T. Ashizawa, C. Abbruzzese, E. Roeder, P. Carango, M. Giacaneli, V.L. Funanage, M.J. Siciliano, Effect of myotonic dystrophy trinucleotide repeat expansion on DMPK transcription and processing, *Genomics* 28 (1995) 1–14.
- [185] M.G. Hamsheer, E.E. Newman, M. Alwazzan, B.S. Athwal, J.D. Brook, Transcriptional abnormality in myotonic dystrophy affects DMPK but not neighboring genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 7394–7399.
- [186] T.R. Klesert, A.D. Otten, T.D. Bird, S.J. Tapscott, Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP, *Nat. Genet.* 16 (1997) 402–406.
- [187] C.A. Thornton, J.P. Wymer, Z. Simmons, C. McClain, R.T. Moxley III, Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene, *Nat. Genet.* 16 (1997) 407–409.
- [188] 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.
- [189] S. Reddy, D.B. Smith, M.M. Rich, J.M. Leferovich, 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.
- [190] 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.
- [191] 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.
- [192] E. Querido, F. Gallardo, M. Beaudoin, C. Menard, P. Chartrand, Stochastic and reversible aggregation of mRNA with expanded CUG-triplet repeats, *J. Cell Sci.* 124 (2011) 1703–1714.
- [193] S. Paul, W. Dansithong, S.P. Jog, I. Holt, S. Mittal, J.D. Brook, G.E. Morris, L. Comai, S. Reddy, Expanded CUG repeats dysregulate RNA splicing by altering the stoichiometry of the muscleblind 1 complex, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 38427–38438.
- [194] S.A. Mulders, B.G. van Engelen, B. Wieringa, D.G. Wansink, Molecular therapy in myotonic dystrophy: focus on RNA gain-of-function, *Hum. Mol. Genet.* 19 (2010) R90–R97.
- [195] E.P. Foff, M.S. Mahadevan, Therapeutics development in myotonic dystrophy type 1, *Muscle Nerve* 44 (2011) 160–169.
- [196] 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.
- [197] C.M. Chamberlain, L.P. Ranum, Mouse model of muscleblind-like 1 overexpression: skeletal muscle effects and therapeutic promise, *Hum. Mol. Genet.* 21 (2012) 4645–4654.
- [198] 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.
- [199] 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.
- [200] D.S. Berger, A.N. Ladd, Repression of nuclear CELF activity can rescue CELF-regulated alternative splicing defects in skeletal muscle models of myotonic dystrophy, *PLoS Curr.* 4 (2012), (RRN1305).
- [201] A. Ravel-Chapuis, G. Belanger, R.S. Yadava, M.S. Mahadevan, L. DesGroseillers, J. Cote, B.J. Jasmin, The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing, *J. Cell Biol.* 196 (2012) 699–712.
- [202] A.L. Southwell, N.H. Skotte, C.F. Bennett, M.R. Hayden, Antisense oligonucleotide therapeutics for inherited neurodegenerative diseases, *Trends Mol. Med.* 18 (2012) 634–643.
- [203] 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.
- [204] K. Sobczak, T.M. Wheeler, W. Wang, C.A. Thornton, RNA interference targeting CUG repeats in a mouse model of myotonic dystrophy, *Mol. Ther.* 21 (2013) 380–387.
- [205] A.J. Leger, L.M. Mosquea, N.P. Clayton, I.H. Wu, T. Weedon, C.A. Nelson, L. Phillips, E. Roberts, P.A. Piepenhagen, S.H. Cheng, B.M. Wentworth, Systemic delivery of a peptide-linked morpholino oligonucleotide neutralizes mutant RNA toxicity in a mouse model of myotonic dystrophy, *Nucleic Acid Ther.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1089/nat.2012.0404> (Electronic publication ahead of print).

- [206] M. Nakamori, G. Gourdon, C.A. Thornton, Stabilization of expanded (CTG)<sup>n</sup> (CAG) repeats by antisense oligonucleotides, *Mol. Ther.* 19 (2011) 2222–2227.
- [207] 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.
- [208] L.O. Ofori, J. Hoskins, M. Nakamori, C.A. Thornton, B.L. Miller, From dynamic combinatorial 'hit' to lead: in vitro and in vivo activity of compounds targeting the pathogenic RNAs that cause myotonic dystrophy, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 6380–6390.
- [209] A. Pushechnikov, M.M. Lee, J.L. Childs-Disney, K. Sobczak, J.M. French, C.A. Thornton, M.D. Disney, Rational design of ligands targeting triplet repeating transcripts that cause RNA dominant disease: application to myotonic muscular dystrophy type 1 and spinocerebellar ataxia type 3, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 9767–9779.
- [210] R. Parkesh, J.L. Childs-Disney, M. Nakamori, A. Kumar, E. Wang, T. Wang, J. Hoskins, T. Tran, D. Housman, C.A. Thornton, M.D. Disney, Design of a bioactive small molecule that targets the myotonic dystrophy type 1 RNA via an RNA motif-ligand database and chemical similarity searching, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 4731–4742.
- [211] A. Kumar, R. Parkesh, L.J. Sznajder, J.L. Childs-Disney, K. Sobczak, M.D. Disney, Chemical correction of pre-mRNA splicing defects associated with sequestration of muscleblind-like 1 protein by expanded r(CAG)-containing transcripts, *ACS Chem. Biol.* 7 (2012) 496–505.
- [212] M.D. Disney, B. Liu, W.Y. Yang, C. Sellier, T. Tran, N. Charlet-Berguerand, J.L. Childs-Disney, A small molecule that targets r(CGG)(exp) and improves defects in fragile X-associated tremor ataxia syndrome, *ACS Chem. Biol.* 7 (2012) 1711–1718.
- [213] J.L. Childs-Disney, J. Hoskins, S.G. Rzuczek, C.A. Thornton, M.D. Disney, Rationally designed small molecules targeting the RNA that causes myotonic dystrophy type 1 are potently bioactive, *ACS Chem. Biol.* 7 (2012) 856–862.

## **CHAPITRE II.**

### **Les objectifs de ma thèse**

En avril 2003, lors du 4<sup>ème</sup> congrès international sur la dystrophie myotonique (IDMC), un grand nombre de communications se sont concentrées pour la première fois sur l'implication du SNC dans la DM1. Le SNC a longtemps été sous estimé dans la maladie et pourtant, il existait des atteintes neurologiques de la DM1 ayant un fort impact sur la qualité de vie des patients. La liste des manifestations neuropsychologiques de la maladie est lourde et variée, comprenant des troubles du sommeil, déficit des fonctions cognitives, de la rapidité d'exécution et de la mémoire visuo-spatiale, problèmes d'interaction sociale et d'apprentissage, apathie, anhédonie et un comportement autistique chez l'enfant (Angeard et al., 2007 ; Angeard et al., 2011 ; Ekstrom et al., 2008 ; Meola et al., 2003; Meola and Sansone, 2007). La communauté scientifique de la DM1 a donc réalisé qu'il était urgent de mieux comprendre le mécanisme neuropathologique de la maladie. Les efforts de recherche sur les mécanismes de la maladie dans le SNC sont illustrés par plusieurs travaux publiés dans les 10 dernières années (Dhaenens et al., 2008 ; Dhaenens et al., 2011 ; Hernandez-Hernandez et al., 2013a ; Hernandez-Hernandez et al., 2013b ; Huguet et al., 2012 ; Jiang et al., 2004 ; Marteyn et al., 2011 ; Meola and Sansone, 2007 ; Minnerop et al., 2008; Panaite et al., 2011 ; Sergeant et al., 2001). Pourtant, il reste encore du chemin à parcourir pour mieux comprendre la neuropathogénèse de la DM1.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était de mieux comprendre les régions cérébrales, les populations cellulaires, les circuits neuronaux, les voies moléculaires et les fonctions neurologiques perturbés dans la DM1. Pour cela, je me suis appuyée sur le modèle murin DMSXL, développé au sein du laboratoire. Ces souris reproduisent des caractéristiques neurologiques importantes de la DM1, à la fois au niveau moléculaire et physiologique (Hernandez-Hernandez et al., 2013a ; Hernandez-Hernandez et al., 2013b). Dans un souci de validation, j'ai également utilisé des échantillons de différentes régions du cerveau de patients DM1, ainsi que différents modèles cellulaires qui seront présentés ultérieurement.

Ainsi, mes travaux de thèse ont donné lieu à l'intitulé suivant : **Etudes des conséquences pathologiques des expansions CTG sur le système nerveux central d'un modèle murin de la dystrophie myotonique de Steinert: Approches moléculaires, protéomiques et cellulaires.**

Ma thèse est organisée en quatre parties expérimentales.

## **I. Etude de la splicéopathie dans le SNC d'un modèle murin de la DM1: les souris DMSXL**

Le mécanisme le plus généralement admis, pour expliquer une partie des symptômes de la DM1, est l'effet *trans*-dominant des répétitions CUG sur l'épissage alternatif. En effet, plusieurs défauts d'épissage ont été décrits comme étant en partie impliqués dans différents symptômes observés au niveau des muscles squelettiques et du cœur (Charlet et al., 2002 ; Fugier et al., 2011 ; Mankodi et al., 2002 ; Philips et al., 1998 ; Savkur et al., 2004). Quelques défauts d'épissage ont aussi été décrits dans le cerveau des patients DM1 (Charizanis et al., 2012 ; Jiang et al., 2004 ; Sergeant et al., 2001 ; Suenaga et al., 2012) ainsi que dans des modèles murins de la DM1 (Charizanis et al., 2012 ; Hernandez-Hernandez et al., 2013b ; Suenaga et al., 2012). Mais le lien mécanistique entre ces défauts et les atteintes neurologiques reste méconnu. Ainsi, pour mieux comprendre l'impact des expansions CTG sur le cerveau, la susceptibilité des différentes régions cérébrales à la toxicité ARN a été explorée dans un modèle murin de la DM1, les souris DMSXL. La progression de la splicéopathie avec l'âge a aussi été étudiée dans ce modèle transgénique. Cette analyse s'est particulièrement intéressée aux régions cérébrales suivantes: le cortex frontal, le tronc cérébral, l'hippocampe, le cervelet et la moelle épinière.

Les résultats obtenus dans cette étude ont participé à l'élaboration des articles suivants :

Hernández-Hernández O, Guiraud-Dogan C, **Sicot G**, Huguet A, Luilier S, Steidl E, Saenger S, Marciniak E, Obriot H, Chevarin C, Nicole A, Revillod L, Charizanis K, Lee KY, Suzuki Y, Kimura T, Matsuura T, Cisneros B, Swanson MS, Trovero F, Buisson B, Bizot JC, Hamon M, Humez S, Bassez G, Metzger F, Buée L, Munnich A, Sergeant N, Gourdon G, Gomes-Pereira M.

Myotonic dystrophy CTG expansion affects synaptic vesicle proteins, neurotransmission and mouse behaviour. *Brain*, 2013, 136: 957-70.

Hernández-Hernández O\*, **Sicot G\***, Dinca DM, Huguet A, Nicole A, Buée L, Munnich A, Sergeant N, Gourdon G, Gomes-Pereira M.

Synaptic protein dysregulation in myotonic dystrophy type 1: disease neuropathogenesis beyond missplicing. *Rare diseases*, 2013, volume 1, issue 2 (*in press*).

\* Ces deux auteurs ont contribué de manière équivalente à cet article.

Suite à cette étude, deux points intéressants se sont détachés et donneront lieu aux études dont les objectifs sont développés dans les parties II. et III. de ce chapitre.

## **II. Etude de l'implication du cervelet dans la neuropathogénèse de la DM1.**

Dans la recherche de régions cérébrales particulièrement touchées par les expansions CTG, le cervelet s'est avéré être un bon candidat. En effet, des données phénotypiques, électrophysiologiques et moléculaires ont suscité mon intérêt pour cette région et pour son implication dans la DM1. S'écarter un peu des principales hypothèses histopathologiques proposées dans la DM1 nous a permis de récolter des données qui montrent l'implication d'une région cérébrale inattendue, ainsi que la dérégulation de l'homéostasie du glutamate. Le mécanisme pathologique de la DM1 semble aussi opérer dans d'autres régions que celle du cortex frontal et du tronc cérébral, sur lesquelles les études initiales se sont focalisées. Ainsi, ce chapitre reprendra les résultats de comportement, électrophysiologiques et moléculaires qui incriminent le cervelet et suggèrent son dysfonctionnement dans la DM1. L'ensemble de ces travaux fait l'objet d'un manuscrit en préparation :

**Sicot G, Prigogine C, Gall D, Medja F, Chuon C, Huguet A, Nicole A, Furling D, Guerrero C, Munnich A, Chéron G, Servais L, Gourdon G, Gomes-Pereira M.**  
The molecular, electrophysiological and behavioural deficits in the cerebellum of a mouse model of myotonic dystrophy type I points to cell type-specific sensitivity to RNA toxicity.

## **III. Etude de l'homéostasie calcique en réponse à l'expression des expansions CTG**

Dans l'objectif d'identifier les voies et les intermédiaires métaboliques altérés dans la pathologie, une approche globale protéomique sur le modèle murin du laboratoire a été réalisée avant mon arrivée. Cette approche protéomique a révélé la dérégulation d'une trentaine de protéines candidates au niveau du cortex frontal et du tronc cérébral. Parmi elles, plusieurs protéines altérées semblent être impliquées dans les voies de régulation de l'homéostasie et du métabolisme du calcium. De plus, les résultats obtenus dans le cadre de l'étude de la splicéopathie dans le système nerveux central des souris DMSXL argumentent en faveur d'une dérégulation des gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie calcique. Ainsi, dans le but d'étudier les conséquences des expansions CTG sur les variations calciques cellulaires, j'ai établi et caractérisé un modèle cellulaire cérébral de la DM1. Ce

dernier consiste en des cultures primaires dérivées du cerveau d'embryons DMSXL. Ce modèle m'a permis d'étudier la régulation du niveau calcique cellulaire en réponse à l'expression des expansions CTG. Les résultats obtenus sont rassemblés dans un manuscrit en cours de préparation :

**Sicot G**, Capiod T, Fernandez-Hernandez F, Gérard C, Munnich A, Sergeant N, Gourdon G, Gomes-Pereira M.

Calcium metabolism dysregulation of a brain cell model of myotonic dystrophy type I.

#### **IV. Validation *in vitro* d'une stratégie thérapeutique de remplacement du facteur d'épissage MBNL1 séquestré par les ARNs toxiques**

Différentes stratégies thérapeutiques, développées dans le chapitre introductif, ont été envisagées dans le cadre de la DM1. Parmi elles, plusieurs études se sont concentrées sur le blocage de l'accès aux répétitions CUG par des facteurs liant l'ARN (Warf et al., 2009 ; Wheeler et al., 2009). C'est ce type d'approche qui a été sélectionné par l'équipe de Nicolas Sergeant. Dans le cadre de ce projet, j'ai collaboré à la validation *in vitro* d'une stratégie thérapeutique de remplacement du facteur d'épissage MBNL1 séquestré par les ARNs toxiques. Pour cela, j'ai utilisé le modèle cellulaire cérébral de la DM1, développé et caractérisé dans le chapitre VI, pour étudier les effets bénéfiques de cette stratégie dans un cadre neurologique, et particulièrement les effets sur la correction des défauts d'épissage préalablement décrits.

Dans le but de comprendre la neuropathogenèse de la DM1, mes travaux de thèse sont le résultat de différentes approches pour caractériser les régions cérébrales, les populations cellulaires et les évènements moléculaires particulièrement susceptibles à la toxicité des expansions CTG et pour contribuer à la validation *in vitro* de stratégies thérapeutiques de la DM1.

## **CHAPITRE III.**

### **Matériels et méthodes**



## I. MATÉRIELS CHIMIQUES ET CONSOMMABLES

### I.1. Réactifs, poudres ou solutions chimiques

L'ensemble des réactifs, poudres ou solutions chimiques utilisés pour mes travaux de thèse est listé dans le Tableau I.1 ci-dessous.

Produit	Compagnie	Référence
30% acrylamide/bis (ratio 29:1)	Sigma	A3574
Acétone	CarloErba	400971
Acide formique 99%	Sigma	279404
Agarose	Life Technologies	16500-500
Ampholytes pH 3 – pH 10	Sigma	10043
APS	Sigma	7727540
$\beta$ -2-mercaptoethanol	Sigma	M3148
Blotto, non-fat dry milk	Santa Cruz	sc-2325
BSA	Sigma	14503
CHAPS	Sigma	C3023-5g
Chloroforme	Carlo Erba	67-66-3
citrate Tris sodium	Sigma	S1804
cOmplete Mini	Roche	04693124001
DAPI	Sigma	D9542
DC <sup>TM</sup> Protein Assay	Bio-Rad	500-0113-15
Digitonine	Sigma	D5628
DNase I	Roche	11284932001
dNTP	Life Technologies	10297018
dNTPs (2,5 mM chacun)	GE Healthcare	28406551
DTT	Sigma	D-5545
DPX mounting medium	Sigma	06522
EGTA	Sigma	E4378-100G
Eosine	Sigma	HT110332
Ethanol 100%	Carlo Erba	64-17-5
Fluo-4 AM	Life Technologies	F-14201
Formamide	Sigma	47670
Glycine	VWR	24403
GoTaq® Green Master Mix 2X	Promega	M7113
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma	H1009
HCl	Carlo Erba	403871
Hématoxyline	Sigma	MHS32
Hexamères	Amersham Biosciences	27-2166-01
Iodoacétamide	Sigma	I1149
Isopentane	CarloErba	415154
Méthanol	Carlo Erba	414814
MMLV	Life Technologies	8080018
NaCl	VWR	1.06404.1000
NGS	Jackson immunoresearch	005-000-121
PAF	Sigma	P6148
PageRuler Plus Prestained	Fermentas	SM1811
PBS 1X	Life Technologies	14190-094
PCR buffer II (10x)	Applied	N8080241
PCR mix	Thermo Scientific	SM-0005
Phénol-chloroforme	Life Technologies	15593049
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma	04906845001
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Life Technologies	4368708
Protein Ladder	Fermentas	SM1811
Protéinase K	Life Technologies	25530-015
PureLink® DNase Set	Life Technologies	12185-010
Ribonucleoside vanadyl complex	Sigma	R3380
RIPA	Thermo Scientific	89901
RNase A	Life Technologies	12091-021
RNasin	Stratagene	300152

Produit	Compagnie	Référence
SDS	Sigma	05030
SSC 20X	Euromedex	EU0300B
Taq	Applied	N8080241
Temed	Life Technologies	15524-010
TBE 10X	Life Technologies	15581-028
Thermopfect Taq polymérase	Integro	33049900
Thiourée	Prolabo	28615.231
Tris base	VWR	648311
Triton X-100	Sigma	T8787
TRIzol® reagents	Life Technologies	15596-026
Tween 20	Sigma	P7949
Urée	Sigma	U-0631
Vectashield mounting medium	Biovalley	H-1400
Western lightening® Plus-ECL	PerkinElmer	NEL103001EA
Western lightening® ECL	PerkinElmer	NEL100001EA
Xylène	CarloErba	492301
Yeast tRNA	Life Technologies	15401-011

Tableau I.1. Réactifs, poudres ou solutions chimiques

## I.2. Solutions pour la culture cellulaire

L'ensemble des solutions pour la culture cellulaire utilisées au cours de ma thèse est listé dans le Tableau I.2 ci-dessous.

Solution	Compagnie	Référence
Antibiotic-Antimycotic (100X)	Life Technologies	15240-096
B27 complement	Life Technologies	17504-044
DMEM low glucose	Life Technologies	31885-023
DMEM 1X, High glucose, Pyruvate no glutamine	Life Technologies	21969035
Fœtal bovine serum	Life Technologies	10270
Gentamycine	Life Technologies	15710
HBSS w/out Ca <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup>	Life Technologies	14175
HEPES	Life technologies	15630
Laminin	Sigma	L2020-1MG
Leibovitz's L-15 medium	Life Technologies	11415-049
L-glutamin	Life Technologies	25030-024
Neurobasal medium	Life Technologies	2110349
Opti-MEM® I Reduced		
Serum Medium	Life Technologies	31985
Penicillin/ streptomycine	Life technologies	15140
Poly-D-Lysine	Sigma	P6407-5MG
Trypsin-ÉDTA	Life Technologies	25300

Tableau I.2. Solution et media utilisés pour la culture cellulaire

## I.3. Consommables plastiques et autres

L'ensemble des consommables plastiques utilisés pour mes travaux de thèse est listé dans le Tableau I.3 ci-dessous.

Consommable	Compagnie	Référence
100mm dish	Dutscher	353003
AdhesiveCap 500 clear	Zeiss	4151014400255
Boîte de Pétri	Dutscher	193100
Cryotubes	Dutscher	055005
Glass chamber slide system, 8-well	Thermo Scientific	177402
Gratoir de cellules	Dutscher	353085
Microplaques de 24 puits noires	Berthold Technologies	41082
Plaque de 6 puits	Dutscher	009206
Plaque de 12 puits	Dutscher	109212
Pipettes 5 mL	Sarstedt	861254001
Pipettes 10 mL	Sarstedt	86125400
Pipettes 25 mL	Sarstedt	861685001
Tube 0.5 mL	Dutscher	054816
Tube 1.5 mL	Dutscher	054817
Tube 15 mL	Sarstedt	62554512
Tube 50 mL	Sarstedt	62547254

Tableau I.3. Consommables plastiques

D'autres matériels divers a aussi été utilisés pendant mes travaux de thèse et sont listés dans le Tableau I.4 ci-dessous.

Matériel	Compagnie	Référence
Aiguille 25 G	Dutscher	050151
Aiguille 21 G	Dutscher	050106
Fuji medical film 24*30	EIS	100NIF
Membrane de nitrocellulose	PerkinElmer	NEF1002001PK
Papier whatman	Dutscher	36347
Ready strip™ IPG strips	Bio-Rad	163-2000
Sarcophage	GE Healthcare	80-6416-11

Tableau I.4. Autres matériels

#### I.4. Kits

Les différents kits utilisés pour mes travaux de thèse sont listés dans le Tableau I.5 ci-dessous.

Kit	Compagnie	Référence
Chromogen System	DakoCytomotion	K3468
Cleavable ICAT® Reagent Kit	AB Sciex	
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, POD	Roche	11684817910
iTRAQ™ Reagent Multiplex Kit	AB Sciex	4352135
LCM staining kit	Ambion	AM1935
Lipofectamine® LTX & Plus Reagent	Life technologies	15338
Liquid DAB+ Substrate		
Reverse transcriptase	Life Technologies	18064
SuperScript II RNase H-		
TRIzol® plus RNA Purification kit	Life Technologies	12183-555
TRIzol® reagents	Life Technologies	15596-026

Tableau I.5. Kits

## II. MATERIELS EXPERIMENTAUX

### II.1. Souris

Le modèle murin DM300 de la DM1 a été initialement généré par le Dr. Geneviève Gourdon sur fond génétique de souris C57bl/6 (Gourdon et al., 1997 ; Seznec et al., 2001). Ces souris sont hébergées au Centre d'Exploration et de Recherche Fonctionnelle Expérimentale (CERFE) à Evry en France ainsi qu'au Laboratoire d'Expérimentation Animale et de Transgénése (LEAT) de la Faculté de Médecine Paris Descartes à Paris.

Les tissus du cerveau des souris déficientes pour *Mbnl1* et *Mbnl2* ont été fournis par le Dr Maury Swanson de l'université de Floride à Gainesville, aux Etats-Unis.

### II.2. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires HEK-293T (CRL-1573) provenant du tissu embryonnaire du rein et de morphologie épithélial, ainsi que la lignée C6 (CCL-107) provenant du cerveau de rat, de type glial et de morphologie fibroblastique sont issues de la compagnie ATCC (American Type Culture Collection).

Les lignées HEK-GLT1 et C6-GLT1, qui surexpriment de manière stable la protéine GLT1, nous ont gentiment été fournies par le Dr. Michael Robinson, Université de Philadelphie aux Etats-Unis.

### II.3. Plasmides

Les plasmides utilisés au cours de mes travaux de thèse sont les suivants :

- DMPKS et DT960, gentiment fournis le Dr Tom Cooper du collège de médecine Baylor à Houston aux Etats-Unis. Les séquences de ces deux plasmides sont disponibles sur le site suivant :

<http://www.bcm.edu/pathimmuno/cooper/index.cfm?pmid=14460#dt960>

- pEGFP-C1 de chez BD Biosciences Clontech (référence #6084-1). La séquence de ce plasmide est disponible sur le site suivant :

<http://www.synthesisgene.com/vector/pEGFP-C1.pdf>

## II.4. Oligonucléotides

L'ensemble des oligonucléotides listés dans cette section a été utilisé soit pour la détermination du statut transgénique des souris utilisées, pour la détermination de la taille des CTG, pour l'analyse de l'épissage alternatif de différents candidats ou pour l'analyse quantitative de l'expression de différents gènes.

### Statut transgénique des souris utilisées

DMRH8                    5'-TGACGTGGATGGGCAAACCTG-3'  
 DMRH9                    5'-AGCTTTGCACTTTGCGAACC-3'  
 Dmm9                    5'-GCTTGTAACCTGATGGCTGGG-3'  
 28 cycles – T°hyb : 60°C

### Détermination de la taille des CTG

101                    5'- CTTCCCAGGCCTGCAGTTTGCCCATC-3'  
 102                    5'- GAACGGGGCTCGAAGGGTCCTTGTAGC-3'  
 30 cycles – T°hyb : 68°C – Dénaturation à 96°C – Elongation à 72°C pendant 3 min

L'ensemble des oligonucléotides utilisés pour les analyses de l'épissage alternatif dans le SNC des souris DMSXL et des patients DM1 est respectivement présenté dans les Tableaux II.1 et II.2.

Région amplifiée	Séquence des amorces en 5'-3'	T°	Nombre de cycles	Tailles attendues (bp)
18S	CAGTGAAACTGCGAATGG CGGGTTGGTTTTGATCTG	60	26	165
<i>App</i> exon 8	ACCGAGAGAACAACCAGCAC GTCTCTCATTGGCTGCTTCC	58	25	556/499/331
<i>Atp2a1</i> exon 22	GTCATGGTCCTCAAGATCTCAC GGTCAGTGCCTCAGCTTTG	63	32	218/177
<i>Cacna1b</i> exon 18a	CAACCTTGCCAATGCCAG GCTTTGACTTGCTCCCAACGG	58	29	374/311
<i>Cacna1d</i> exon 12	CATGCCACCAGCGAGACTGAA CACCAGGACAATCACCAGCCAGTA	61	30	205/260
<i>CaMK2β</i> exon 18/19	GAGGATGAAGATGCCAAG AGGGAGAGTCGGAGATGG	52	30	372/258/129
<i>Dmpk</i>	GGAAGAAAGGGATGTATTA CTCAGCAGCGTTAGCC	52	32	185
<i>Eaat2</i>	CCATCATTGCCGCCGTGC TGACCGCCTGGTGGTATTGG	58	27	249
<i>Fxr1</i> exon15/16	GATAATACAGAATCCGATCAG CTGAAGGACCATGCTCTTCAATCAC	52	29	370/289/194
<i>Gapdh</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	54	26	123
<i>Grin1</i> exon 5	AGCGTCGTCCTCGCTTGAGAA GACAAGAGCATCCACCTGAGCT	72	26	360/297
<i>Grin 1</i> exon 21	GCAGCTGGCCCTCCTCCCTCTC ATGCCCTGCCACCCTCACTTTT	72	26	381/270
<i>Insr</i> exon 11	GAGGATTACCTGCACAACG CACAATGGTAGAGGAGACG	56	26	168/132
<i>Kcnd3</i> exon 6	CCAGAAGAGGAGCAGATGGGC CAGCAGGTGGTGGTGAGGC	57	29	263/186
<i>Kcnma1</i> exon 25	GATTACACCTCCTGGAATGGACAG GTGAGGTACAGCTCTGTGTCAGGGT	57	32	184/265
<i>Mapt/Tau</i> exon 10	CTGAAGCACCAGCCAGGAGG TGGTCTGTCTTGGCTTGGC	60	28	367/274
<i>Ldb3</i> exon 8	TGCTGACAGTGGTAGTGCTCTTTC GGAAGATGAGGCTGATGAGTGG	67	28	760/575
<i>Mbnl1</i> exon 7	TGGTGGGAGAAATGCTGTATGC GCTGCCAATACCAGGTCAAC	65	26	270/216
<i>Mbnl2</i> exon7	CTTTGGTAAGGGATGAAGAGCAC ACCGTAACCGTTTGTATGGATTAC	65	29	255/201
<i>Tanc2</i> exon 23	GCCATGATTGAGCATGTTGACTACGT CCTCTTCCATCAGCTTGCTCAACA	57	28	184/214
<i>Tbp</i>	GGTGTGCACAGGAGCCAAGAGTG AGCTACTGAACTGCTGGTGGGTC	59	27	192

**Tableau II.1. Tableau récapitulatif des conditions de PCR semi quantitative** pour les amorces utilisées pour l'analyse de l'épissage alternatif dans le SNC des souris DMSXL.

Région amplifiée	Séquence des amorces en 5'-3'	T°	Nombre de cycles	Tailles attendues (bp)
<i>APP</i> exon 8	CCACAGAGAGAACCACCAGCATTGC GATACTTGTC AACGGCATCAGGGG	57	30	285/117
$\beta$ -ACTIN	CCGTCTTCCCCTCCATCG CCTCGTCGCCACATAGG	57	26	87
<i>CACNA1B</i> exon 18a	CGAACATCTCCATCGCCGC CCCGCTGCTCCCACACCG	58	31	130/66
<i>CACNA1D</i> exon 12	CATGCCACCAGCGAGACTGAG CACCAGGACGATAACCAGCCAGTA	61	29	205/265
<i>FXR1</i> exon15/16	GCTGTTCTGATGGATGGAATG AGGACTGCTGCTTCTTGAGTG	52	28	297/308/389
<i>GAPDH</i>	AGTCCATGCCATCACTGCCAC TCCACCACCCTGTTGCTGTAG	59	27	447
<i>GRIN1</i> exon 5	CAGTCCAGCGTGTGGTTGAGATG TGGCAGAAAGGATGATGACCCG	60	29	295/232
<i>GRIN1</i> exon 21	CGTGTGGCGGAAGAACCTG CTGTCTGCGGGGAGGGG	60	29	292/181
<i>INSR</i> exon 11	GAGGATTACCTGCACAACG CACAATGGTAGAGGAGACG	56	26	168/132
<i>KCND3</i> exon 6	GCAAGACCACCTCACTCATCG AGGGACTTCTTGTGGATGGGTAG	56	29	207/150
<i>KCNMA1</i> exon 27a	GGTTCACACCTCCAGGAATGGATAGA GTGAGGTACAGTTCTGTATCAGGGTC	55	28	184/265
<i>MAPT</i> exon 10	CAACGCCACCAGGATTCCAGCAAA ATGTTGCCTAATGAGCCACACTTG	56	27	486/393
<i>LDB3</i> exon 8	GATGAGGCTGACGAGTGGGCAC ACTGCGGGGCTGTAGGAAGAGG	60	28	344/155
<i>MBNL1</i> exon 7	GCTGCCCAATACCAGGTCAAC TGGTGGGAGAAATGCTGTATGC	57	28	216/162
<i>MBNL2</i> exon7	ACAAGTGACAACACCGTAACCG TTTGGTAAAGGATGAAGAGCACC	58	29	212/158
<i>TANC2</i> exon 23	GCCATGATCGAGCACGTTGACTACAG CCTCTTCCATCAGCTTGCTCAACA	58	29	184/214

**Tableau II.2. Tableau récapitulatif des conditions de PCR semi quantitative** pour les amorces utilisées pour l'analyse de l'épissage alternatif dans le SNC des patients DM1.

L'ensemble des oligonucléotides utilisés pour l'analyse de l'expression quantitative de gènes dans le SNC des souris DMSXL est présenté dans le Tableau II.3. ci-dessous.

Région amplifiée	Séquence des amorces en 5'-3'	T°	Tailles attendues (bp)
<i>18S</i>	CGGGTTGGTTTTGATCTG CAGTGAAACTGCGAATGG	59	165
<i>Gfap</i>	GCTAACGACTATCGCCGCCAAC TCCAGCCGAGCAAGTGCCTC	60	152
<i>Gapdh</i>	AGGTCGGTGAACGGATTTG TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	60	123
<i>Tbp</i>	GGCCTCTCAGAAGCATCACTA GCCAAGCCCTGAGCATAA	59	167
<i>Eaat2</i>	CCATCATTGCCGCCGTGC TGACCGCCTTGGTGGTATTGG	59	249
<i>Snap25</i>	GCAGGTGAGCGGCATCATCG CCACTTCCCAGCATCTTTGTTGC	58	165
<i>Syp</i>	CCCCCTTCCTTCTCTCCCTCTG CCATCTCCTCTCCACCCATTTTCATC	59	147
<i>Dlg4</i>	CCCACACACATTCCAGAAGTCAG AAGGAGAACTCAAACGGCGTG	60	145
<i>Srr</i>	CTGACCCCAATCTTCATCCTCC AGCCAGTGCCACGCCAGCAGTCG	59	198
<i>Nestin</i>	CTGGCACACCTCAAGATGTCCC GCTGGTCCTCTGGTATCCCAAGG	58	119

**Tableau II.3. Tableau récapitulatif des conditions de PCR quantitative** pour les amorces utilisées pour l'analyse de l'expression de gènes candidats

L'ensemble des oligonucléotides utilisé pour l'analyse de l'épissage alternatif de cellules microdisséquées du cervelet des souris DMSXL est présenté dans le Tableau II.4.

Région amplifiée	Nom des amorces	Séquence des amorces en 5'-3'	Tailles attendues (bp)
<i>Mbn1</i> exon 7	Amorce 1	CAATGTTGGTCACGGGGAATC	270/216
	Amorce 2	GCTGCCCAATACCAGGTCAAC	
	Amorce 3	TGGTGGGAGAAATGCTGTATGC	
<i>Mbn2</i> exon 7	Amorce 1	CCATAGGGACAAATGCGG	255/201
	Amorce 2	ACCGTAACCGTTTGTATGGATTAC	
	Amorce 3	TTGGTAAGGGATGAAGAGC	
<i>Tbp</i>	Amorce 1	CGTGAATCTTGGCTGTAAC	192
	Amorce 2	GGTGTGCACAGGAGCCAAGAG	
	Amorce 3	CTGAACTGCTGGTGGGTC	
<i>Gapdh</i>	Amorce 1	ACGGACACATTGGGGGTAGG	302
	Amorce 2	GCCCTCCACAATGCCAAAG	
	Amorce 3	CATCACCATCTTCCAGGAGCG	

**Tableau II.4. Tableau récapitulatif des conditions de PCR semi quantitative** pour les amorces utilisées pour l'analyse de l'épissage alternatif après microdissection capture laser de cellules du cervelet de souris DMSXL et contrôles.



## II.5. Anticorps

La liste des anticorps primaires utilisés au cours de ma thèse est présentée dans le tableau II.5. ci-dessous.

Antigène	Compagnie ; référence	WB/IHC	Taille (KDa)	Dilution
ANXAV	Epitomics ; 2792-S	WB	36	1/5000
ACTB	BD laboratories ; 612656	WB	42	1/5000
CALB1	Swant ; CB38	WB-IHC	28	1/100000-1/1000
CELF1	Upstate ; 05-621	WB	50	1/1000
CELF2	Sigma ; C9367	WB	52	1/1000
DNM1	Santa Cruz ; sc-11362	WB	100	1/3000
EAAT1	Abcam ; ab416	WB	60	1/1000
EAAT2	Ozyme ; #3838	WB	65	1/1000
EAAT4	Santa Cruz ; sc-50403	WB	67	1/1000
FOX1	Abcam ; ab83574	IHC	N/A	1/400
FOX2	Abcam ; ab57154	IHC	N/A	1/400
FOX3/NeuN	Chemicon ; MAB377	IHC	N/A	1/400
GFAP	DakoCytomation ; Z0334	IHC	N/A	1/800
GRIN1	BD pharmingen ; 556308	IHC	N/A	1/100
HPCAL1	Abcam ; ab24560	WB	23	1/1000
MAP2	Santa Cruz ; sc-80013	IHC	N/A	1/400
MBNL1	MB1A de Glen Morris	IHC	N/A	1/10
MBNL2	MB2A de Glen Morris	IHC	N/A	1/10
MOG	Epitomics ; 3342-S	WB	28	1/5000
NCALD	Santa Cruz ; sc-14814	WB	22	1/5000
PKC $\alpha/\beta$	BD transduction ; 610107	WB	82	1/5000
phospho-PKC $\alpha/\beta$	Cell signaling ; 9375S	WB	82	1/5000
Polyglutamine (PolyQ)	Millipore ; MAB1574	IHC	N/A	1/500
TUBB	Covance ; PRB-435P	WB	55	1/5000
Ubiquitin (Ub)	DakoCytomation ; Z0458	IHC	N/A	1/400

**Tableau II.5. Tableau récapitulatif des conditions d'utilisation et des références des anticorps primaires** utilisés au cours de ma thèse. Les anticorps primaires ont été utilisés pour les expériences de western blot (WB) et/ou d'immunohisto/cytochimie (IHC). N/A : Non applicable.

La liste des anticorps secondaires utilisés au cours de ma thèse est présentée dans le tableau II.6. ci-dessous.

Anticorps secondaire	Référence	WB/IHC	Dilution
Goat anti-rabbit	DakoCytomation ; P0448	WB	1/5000
Goat anti-mouse	Cell signaling ; #7076	WB-IHC	1/5000-1/500
Sheep anti-mouse	Jackson research ; 515-035-062	IHC	1/500
Alexa fluor 488 goat anti-mouse	Life Technologies ; A-11001	IHC	1/800
Alexa fluor 488 goat anti-rabbit	Life Technologies ; A-11034	IHC	1/800

**Tableau II.6. Tableau récapitulatif des conditions d'utilisation et des références des anticorps secondaires** utilisés au cours de ma thèse. Les anticorps primaires ont été utilisés pour les expériences de western blot (WB) et/ou d'immunohisto/cytochimie (IHC). N/A : Non applicable.

### III. SOLUTIONS

#### III.1. Solutions générales

##### Réaction de PCR semi quantitative (volume final de 10 $\mu$ L)

GoTaq® Green Master Mix 1X, 1  $\mu$ M de chaque amorces

##### Tampon de lyse des tissus

100 mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM EDTA pH 8, 0.2% (v/v) SDS et 200 mM NaCl

##### Tampon d'homogénéisation

0.5% (w/v) de CHAPS, 1X cOmplete Mini, 1X PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail, 1X RIPA.

##### 1X SDS sample buffer

1.5 M Tris-HCl/SDS pH 8.8, glycérol 20%, 1 g SDS, traces de bleu de bromophénol, 5% (v/v)  $\beta$ -2mercaptoéthanol additionné extemporanément

##### Composition de gels SDS-PAGE

Concentration du gel (%)	3.9	7.5	10	12
30% acrylamide/bis (mL)	0.4	2	2.66	3.2
0.5 M Tris-HCl/SDS pH 6.8 (mL)	0.75			
1.5 M Tris-HCl/SDS pH 8.8 (mL)		2	2	2
H <sub>2</sub> O (mL)	1.83	4	3.33	2.8
APS 10% ( $\mu$ L)	50	65	65	65
Temed ( $\mu$ L)	5	5.5	5.5	5.5

Tableau III.1. Composition de gels SDS-PAGE pour différentes concentrations d'acrylamide/bisacrylamide.

##### 0.5 M Tris-HCl/SDS pH 6.8

0.5 M Tris base, ajuster le pH à 6.8 avec du HCl, ajouter 0.4% (v/v) SDS

##### 1.5 M Tris-HCl/SDS pH 8.8

1.5 M Tris base, ajuster le pH à 8.8 avec du HCl, ajouter 0.4% (v/v) SDS

##### Tampon de migration

25 mM Tris, 250 mM glycine, 0.1% (v/v) SDS

##### Tampon de transfert 1X

25 mM Tris-HCl pH 8.8, 192 mM glycine, 20% (v/v) de méthanol, 0.1% (v/v) SDS

##### TBST 1X

10 mM Tris-HCl, 0.15 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20

##### Solution de stripping

2% (v/v) SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM  $\beta$ -2mercaptoéthanol

**Tampon de solubilisation**

8 M urée, 2.5 M thiourée, 4% (w/v) CHAPS

**Tampon d'équilibration**

6 M urée, 50 mM Tris-HCL pH 8, 4% (v/v) SDS

**Tampon de lavages des strips**

Tampon 1 tampon d'équilibration supplémenté avec 100 mg DTT

Tampon 2 tampon d'équilibration supplémenté avec 250 mg  
d'iodoacetamide

Tampon 3 tampon d'équilibration coloré avec du bleu de bromophénol

**Tampon d'hybridation de la FISH**

30% (v/v) formamide, SSC 2X, 0.02% (w/v) BSA, 2 mM ribonucleoside vanadyl complex, 66 µg/mL yeast tRNA, 1 ng/µL de sonde PNA (Eurogentec 3'-CAGCAGCAGCAGCAG-5' CY3), qsp H<sub>2</sub>O

**III.2. Solutions pour les cultures cellulaires****III.2.1. Cultures primaires****Solution de Leibovitz's L-15**

Milieu Leibovitz's L-15, complémenté avec 30 mM de glucose

**Solution HBSS**

HBSS w/out Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, 20 mM HEPES

**Solution ATV**

Solution HBSS, 0.05% trypsin-EDTA

**Solution neurobasale**

Neurobasal medium, B27 complement 1X, 50 µM L-glutamine, Antibiotic-Antimycotic 1X

**Solution astrocytaire**

DMEM low glucose, 10% FBS, 0.5 mg/mL Gentamycine

**III.2.2. Cultures de lignées cellulaires**

Les lignées HEK-293T, C6, HEK-GLT1, C6-GLT1 sont cultivées avec *DMEM 1X, High glucose, Pyruvate, no glutamine*, supplémenté avec 10% de FBS (inactivé à 50°C pendant 30 min), 100 U/mL de Penicillin/streptomycine et 2 mM L-glutamine.

### III.3. Solutions pour la mesure du flux calcique

#### **Solution HBSS pour mesure calcique**

116 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 20mM HEPES

Selon les expériences, ce milieu est supplémenté soit avec 150 μM EGTA (condition calcium 0) soit avec 1.8 mM de CaCl<sub>2</sub> (condition calcium)

## IV. METHODES

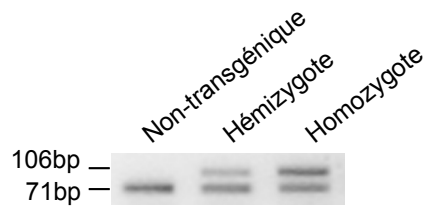
### IV.1. Extraction d'ADN

Une biopsie de queue (0.5 cm) (ou de tissus disséqués) est prélevée sur des souris lors du sevrage à l'âge de 3 à 5 semaines afin de réaliser l'extraction d'ADN. Les morceaux de queues sont lysés dans un volume de 500 μL de tampon de lyse complétementé avec 200 μg/mL de Protéinase K sur la nuit à 50-55°C. Une fois lysés, les échantillons sont centrifugés (Sigma ; Roto Nr.12024-H) à 10000 g pendant 10 min à température ambiante (TA). Le surnageant est récupéré et 400 μL de phénol-chloroforme sont ajoutés. Le tout est secoué pendant 30 sec et mis à centrifuger à 10000 g pour 5 min. La phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube et mixée avec 400 μL de chloroforme. Le tout est mixé pendant 30 sec et mis à centrifuger à 10000 g pour 5 min. La phase aqueuse est de nouveau récupérée dans un nouveau tube et mixée avec 800 μL d'éthanol 100%. Après précipitation de l'ADN, une centrifugation de 10 min à 10000 g est réalisée. Le culot d'ADN est resuspendu dans 400 μL d'éthanol 70% et centrifugé à 10000 g pour 10 min. Le surnageant est retiré et le culot séché à TA. Ce dernier est ensuite resuspendu dans ~ 300 μL d'eau ultra pure, filtrée et désionisée (ce volume peut varier selon la taille du culot obtenu).

### IV.2. Génotypage

Le statut transgénique des souris (avec ou sans transgène) est déterminé par PCR semi-quantitative avec des amorces spécifiques du gène *DMPK* humain et murin DMRH8, DMRH9 et Dmm9 (Section II.4). La réaction de PCR est supplémentée avec 1 μM de MgCl<sub>2</sub>. Le produit de PCR est ensuite analysé sur un gel d'agarose à 2.5% (w/v) dans du TBE 1X supplémenté de 100 mg/ml de bromure d'éthidium (BET). Le couple d'oligonucléotides Dmm9/DMHR8 amplifie le gène

murin *Dmpk* endogène et donne un produit de PCR de 71 bp. Le couple DMRH8/DMHR9 amplifie le transgène humain *DMPK* et donne un produit de PCR de 106 bp. Les souris non transgéniques ne possèdent pas le transgène humain *DMPK*, un seul produit de PCR de 71 bp sera détecté. Les souris hémizygotés expriment *Dmpk* endogène et le transgène *DMPK*, un produit de PCR de 71 bp et de 106 bp seront détectés. Les souris homozygotes expriment *Dmpk* endogène et le transgène *DMPK* deux fois plus que les souris hémizygotés, un produit de PCR de 71 bp ainsi qu'un produit PCR de 106 bp, deux fois plus intense que pour les homozygotes seront détectés (Figure IV.1.).



**Figure IV.1. Exemple d'un génotypage**, sur gel d'agarose, d'une souris non-transgénique, hémizygoté et homozygoté, après PCR semi quantitative.

### IV.3. Détermination de la taille des répétitions

Pour la détermination de la taille des répétitions CTG, 15 ng d'ADN génomiques sont amplifiés par PCR semi quantitative dans un volume final de 25  $\mu$ L : PCR mix 1X, complété extemporanément par 6.7 mM  $\beta$ -2-mercaptoethanol, 0.4  $\mu$ M de chaque des amorces 101 et 102 (Section II.4) qui encadrent les CTG, et 0.04 U de Thermopfect Taq polymérase. La PCR se déroule sur 30 cycles de 45 sec à 96°C, 30 sec à 68°C et 3 min à 72°C précédés d'une dénaturation de 5 min à 96°C et terminée par une phase d'extension de 10 min à 72°C. Le produit PCR est déposé sur gel d'agarose de 0.8% (w/v) dans du TBE 1X. La taille finale du produit de PCR inclut les répétitions CTG et une région de 114 bp au total flanquant les expansions. Le nombre des répétitions d'un triplet CTG est obtenu en divisant la taille totale du produit, préalablement soustraite de 114 bp, par trois. Dû à une mosaïque somatique, il est possible d'obtenir plusieurs bandes pour un même individu.

#### IV.4. Caractérisation moléculaire

##### IV.4.1. Dissection

L'euthanasie de la souris est réalisée par dislocation cervicale pour une mort instantanée sans douleur et avec une détresse minimale pour l'animal. La souris est immédiatement disséquée: le cerveau est extrait de la boîte crânienne afin de réaliser une microdissection des régions étudiées (hippocampe, cortex frontal, cortex temporal, cervelet et tronc cérébral). La moelle épinière est ensuite disséquée. Les tissus disséqués sont stockés dans des cryotubes et congelés dans l'azote liquide. Les tubes sont ensuite mis à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour une longue conservation.

##### IV.4.2. Extraction d'ARN

L'extraction se fait suivant le protocole du kit TRIzol® plus RNA Purification. Une étape additionnelle, qui consiste en l'incubation pendant 15 min avec une DNase (PureLink® DNase Set: 8  $\mu\text{L}$  de 10x DNase I reaction buffer + 10  $\mu\text{L}$  de DNase + 62  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$ ), est réalisée après le premier lavage des colonnes. Puis, la suite du protocole du kit d'extraction se poursuit. Une fois l'extraction réalisée, 1  $\mu\text{L}$  de chaque ARN est dosé au NanoDrop et 300 ng sont déposés sur gel d'agarose 1% pour vérifier la qualité des ARNs.

##### IV.4.3. Transcription inverse (RT)

La transcription inverse est réalisée à partir de 1  $\mu\text{g}$  d'ARN. 0.5 mM de dNTP et 50 ng d'hexamères sont ajoutés aux ARNs, qsp 10  $\mu\text{L}$ . Le tout est incubé pendant 10 min à  $70^{\circ}\text{C}$ . 0.5 mM de RT buffer 5X et 0.01 M de DTT sont ajoutés aux échantillons et le tout est incubé pendant 10 min à température ambiante. Après une incubation de 2 min à  $42^{\circ}\text{C}$ , 1  $\mu\text{L}$  de SuperScript II RNase H-Reverse transcriptase est ajouté à chaque échantillon. Le tout est incubé pendant 50 min à  $42^{\circ}\text{C}$ . Après inactivation de la SuperScript II RNase H-Reverse transcriptase pendant 15 min à  $70^{\circ}\text{C}$ , les ARNs sont digérés avec 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de RNase A pendant 20 min à  $37^{\circ}\text{C}$ . En parallèle, des contrôles négatifs (sans SuperScript II RNase H-Reverse transcriptase) sont réalisés pour tester la contamination des ARNs par l'ADN génomique. Afin de vérifier le succès de la RT et l'absence de contamination d'ADN génomique dans les ADNc, l'expression du gène *Dmpk* (Tableau II.1) est testée.

#### IV.4.4. Analyse de l'épissage alternatif

Pour l'analyse de l'épissage alternatif d'un exon, un couple d'oligonucléotides a été désigné afin d'hybrider de part et d'autre de chaque exon étudié. Les différentes conditions des PCRs semi quantitatives réalisées sont résumées dans le tableau II.1. pour les souris DMSXL et dans le tableau II.2. pour les patients DM1. Les conditions générales des PCRs sont les suivantes : 5 min à 94°C, (1 min à 94°C, 30 sec à T<sup>°</sup>hyb, 45 sec à 72°C)<sup>n</sup> et 10 min à 72°C, où n représente le nombre de cycles. Les PCRs sont ensuite stockées à 4°C. La quantification densitométrique des différentes bandes non saturées s'est faite via l'utilisation du logiciel Quantity One Bio-Rad version 4.6.1.

#### IV.4.5. Analyse quantitative en temps réel

L'expression quantitative du gène d'intérêt est déterminée par PCR quantitative en temps réel via l'émission de la fluorescence émise par un agent intercalant inséré dans l'ADN double brins : le *Power SYBR® Green PCR Master Mix*. La PCR quantitative détermine le nombre de cycle seuil à partir duquel le produit PCR est détectable et renseigne donc sur la quantité de matrice initialement présente. Plus le nombre de cycles seuil est petit, plus l'expression du gène est forte. L'expression quantitative du gène d'intérêt est rapporté à l'expression quantitative de deux gènes de référence : *18S* et *Gapdh*.

Pour chaque gène, une gamme étalon est réalisée avec un échantillon référence. Elle comporte 5 points correspondant à des dilutions successives au 1/10<sup>ème</sup>. Pour le gène *18S*, le point de départ de la gamme étalon est à 10 ng à partir d'un ADNc synthétisé. Pour le gène *Gapdh* et le gène d'intérêt, le premier point de la gamme étalon est à 100 ng à partir de 2 µg d'ARN d'un échantillon de référence. Les échantillons à tester sont eux dilués au 1/10000<sup>ème</sup> pour le gène *18S* et au 1/25<sup>ème</sup> pour les autres gènes testés. 10 µL d'ADN sont déposés par puits. Chaque échantillon est fait en triplicate.

Le mix de la PCR, par puits, se compose de 1X *Power SYBR® Green PCR Master Mix*, 5 µM pour chaque amorces (Tableau II.3), qsp 15 µL H<sub>2</sub>O et 10 µL d'ADNc préalablement dilué. Le cycle de PCR commence par une phase de dénaturation de 10 min à 95°C, puis de 40 cycles composés de 15 sec à 95°C et 1 min à 60°C.



#### IV.4.6. Analyse de l'expression protéique

##### Extraction protéique

Pour l'extraction de protéines, 20 à 30 mg de tissus sont homogénéisés dans 400  $\mu$ L de tampon d'homogénéisation. L'homogénéisation de chaque tissu se fait avec 300  $\mu$ L de tampon extemporanément préparé dans un potter d'une capacité de 1 mL et ce sur glace. Le tissu est mécaniquement broyé jusqu'à ce que visuellement tout le tissu soit lysé. L'homogénat est ensuite soniqué sur glace, à une amplitude de 50, 15 x 2 sec. Les protéines sont ensuite mises en rotation pour 2 h à 4°C, puis centrifugées pendant 15 min à 4°C à 12000 g. Le surnageant est conservé à 4°C et le culot est resuspendu avec 100  $\mu$ L de tampon d'homogénéisation frais puis soniqué, incubé à 4°C et centrifugé de la même manière que décrit ci-dessus. Les deux surnageants peuvent être alors mixés.

##### Quantification des protéines

La quantification se fait avec le kit DC<sup>TM</sup> Protein Assay et des mesures d'absorbance ( $\lambda = 750$  nm) avec un spectrophotomètre. La concentration des protéines est calculée par rapport à la gamme étalon d'albumine de sérum bovin (BSA) comme indiqué dans le tableau IV.1. ci-dessous.

Solution d'homogénéisation ( $\mu$ L)	60	54	48	36	24	12	0
Volume de BSA (10 mg/mL) ( $\mu$ L)	0	6	12	24	36	48	60
Concentration ( $\mu$ g/ $\mu$ L)	0	1	2	4	6	8	10

**Tableau IV.1. Composition de la gamme étalon utilisée pour la quantification de protéines au spectrophotomètre.**

30  $\mu$ g de chaque échantillon sont ensuite déposés sur gel SDS-PAGE (section suivante), qui, après migration, sera coloré au bleu de coomassie, afin de vérifier la qualité des protéines.

##### Migration sur gel SDS-PAGE et transfert sur membrane

Avant l'électrophorèse, 30  $\mu$ g de protéines sont dénaturées pendant 5 min à 95°C mixés avec 1X SDS sample buffer. Les protéines sont déposées sur un gel SDS-PAGE d'acrylamide du pourcentage approprié à la taille de la protéine étudiée (Section III.1.). Après une migration de 1 à 2 h à 20 mA sur gel dans le tampon de migration, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose pendant 2 h à 350 mA par gel à 4°C dans du tampon de transfert. Les membranes sont ensuite bloquées pendant 1 h à TA avec du Blotto 5% (w/v) dans du TBST 1X, puis incubées

sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (Tableau II.5). Les membranes sont ensuite lavées 5 min, 10 min puis 15 min dans du TBST 1X, et incubées avec l'anticorps secondaire (Tableau II.6) pendant 1 h à TA puis lavées 5 min, 10 min et 15 min dans du TBST 1X. Le complexe anticorps primaire/anticorps secondaire lié à la peroxydase est visualisé avec du Western lightening® Plus-ECL ou Western lightening® ECL. La membrane est ensuite « stripée » pendant 15 à 30 min en rotation à 50°C dans la solution de stripping. Chacune des protéines détectées est quantifiée avec le logiciel Quantity One Bio-Rad version 4.6.1.

### **Gel d'électrophorèse en deux dimensions**

Les protéines sont extraites comme décrit dans la section IV.4.6. 10 µg de chaque échantillon protéique sont mixés avec 150 µL de tampon de solubilisation. Ce tampon est passé sur un filtre de 0.45 µm et stocké à -20°C en aliquot de 500 µL. Extemporément, 50 mM final de DTT sont rajoutés au tampon de solubilisation et 0.5% (v/v) d'ampholytes pH 3 – pH 10 sont rajoutés aux protéines. Ces dernières sont ensuite déposées entre les deux électrodes d'un sarcophage. Puis le strip de 7 cm pH 3 – pH 10, face acrylamide en bas, est délicatement déposé sur les protéines de manière à ne pas faire de bulles. Le tout est recouvert avec environ 1 mL d'huile, puis le couvercle est déposé sur le strip. Les sarcophages sont alors déposés sur le Ettan IPGphor (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) et la première migration est lancée suivant le programme suivant. Etape 1 (la réhydratation): 50 V pendant 12 h, étape 2 : 250 V pendant 1 h, étape 3 : 500 V pendant 1 h, étape 4 : 1000 V pendant 1 h, étape 5 : gradient électrique de 4000 V pendant 1 h, étape 6 : 4000 V pendant 24 h. La dernière étape est arrêtée quand la somme du voltage total atteint 10000 V. Ensuite, les strips sont lavés dans 10ml par strip de trois tampons différents : tampon 1 pendant 15 min à TA, tampon 2 pendant 15 min à TA, tampon 3 pendant 30 min à TA. Chaque strip est ensuite placé sur un gel SDS-PAGE en évitant toutes les bulles entre le strip et le gel résolutif. Le tout est recouvert d'agarose 0.5% (w/v) dans du tampon de migration. Le marqueur de poids moléculaire est déposé sur un bout de papier whatman qui est lui aussi déposé sur le gel résolutif, côté cathode du strip. La migration et le transfert sur membrane, comme précédemment décrit, sont ensuite réalisés.

## IV.5. Caractérisation histologique

### IV.5.1. Protocole de perfusion

La souris est anesthésiée par injection intrapéritonéale du mélange Xylazine (7 mg/Kg) (Rompun), Kétamine (70 mg/Kg) (Merial) dans du *Phosphate Buffered Saline* (PBS) 1X. Une fois endormie, la souris est placée sur le dos sur une planche à dissection. Elle est ouverte de façon à exposer le cœur pour pouvoir ensuite insérer une aiguille 23-25 G dans le ventricule gauche. Avec une autre aiguille, l'atrium droit est percé pour permettre au sang et au tampon de s'écouler. Le PBS est pompé à un flux de 2 mL/min jusqu'à ce que le liquide sortant soit clair ou bien que le foie ait perdu sa couleur rouge (signe caractéristique que la majorité du sang est expulsé du corps de la souris). La solution de paraformaldéhyde (PAF) 4% (w/v) dans du PBS 1X est ensuite pompée pendant 15 min. Les tissus d'intérêt sont disséqués, puis fixés toute une nuit dans 4% (w/v) PAF à 4°C, puis transférés dans du sucrose 18% pendant 2 à 3 jours avec une légère agitation à 4°C, afin de conserver toutes les structures du tissu. Ils peuvent être ensuite stockés à -80°C avant la découpe au cryostat. Les tissus peuvent être aussi inclus dans un bloc de paraffine et découpés au microtome.

### IV.5.2. Hybridation fluorescente *in situ* (FISH)

Les tissus disséqués sont plongés dans de l'isopentane à -20°C puis transférés à -80°C. Ils sont découpés au cryostat à une épaisseur de 7 µm. Les lames obtenues sont séchées à TA pendant 30 min, puis fixées dans 4% (w/v) PAF dans du PBS 1X pendant 15 min à TA. Elles sont ensuite rincées 5 x 2 min dans du PBS 1X avant d'être incubées pendant 5 min avec 2% (v/v) acétone dans PBS 1X préalablement refroidi. Les lames sont pré-hybridées avec du SSC 2X / 30% (v/v) formamide dans du PBS 1X pendant 10 min avant d'être incubées dans 80 µL de tampon d'hybridation par lame. L'étape d'hybridation dure 2 h à 37°C, à l'abri de la lumière et est suivie de 30 min à 50°C dans du SSC 2X/30% (v/v) formamide dans du PBS 1X, puis de 30 min à TA dans SSC 1X. S'il y a une immunohistochimie, se référer à la section IV.5.3., sinon les lames sont incubées pendant 15 min à TA avec du 0.0002% (w/v) DAPI dans du PBS 1X, puis lavées 3 x 2 min dans du PBS 1X. Le montage se réalise en déposant une goutte de milieu de montage (Vectashield mounting medium) sur laquelle est déposée une lamelle scellée par la suite avec du vernis à ongles. Les lames sont gardées à 4°C en attendant l'observation au microscope à fluorescence.

#### IV.5.3. Immunohistochimie (IHC)

Le tissu d'intérêt est découpé au cryostat à une épaisseur de 7  $\mu\text{m}$ . Les lames obtenues sont séchées à TA pendant 30 min puis fixées au 4% (w/v) PAF dans du PBS 1X pendant 15 min à TA. Elles sont ensuite rincées 5 x 2 min dans du PBS 1X avant d'être incubées pendant 5 min avec 2% (v/v) acétone dans PBS 1X préalablement refroidi. Si une FISH est réalisée se référer à la section IV.5.2 puis revenir quand cela est indiqué. Les lames sont bloquées 1 h à TA avec 10% (v/v) de sérum de chèvre (NGS) dans du PBS 1X. Elles sont ensuite incubées sur toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (Tableau II.5.) dilué dans 10% (v/v) NGS dans du PBS 1X. Les lames sont ensuite lavées 3 x 10 min dans du PBS 1X et incubées avec l'anticorps secondaire (Tableau II.6.) diluée dans 10% (v/v) NGS dans du PBS 1X pendant 1 h à TA. Les lames sont ensuite lavées 3 x 10min dans du PBS 1X, avant d'être incubées avec la solution 0.0002% (w/v) DAPI dans du PBS 1X, puis lavées 3 x 2 min dans du PBS 1X. Le montage se réalise comme décrit en IV.5.2.

#### IV.5.4. Marquage histologique à l'hématoxyline/éosine

Le tissu d'intérêt est découpé au cryostat à une épaisseur de 7  $\mu\text{m}$ . Les lames sont ensuite séchées à TA pendant 30 min puis fixées 4% (w/v) PAF dans du PBS 1X pendant 15 min à TA. Elles sont ensuite rincées 5 x 2 min dans du PBS 1X avant d'être incubées pendant 15 min dans le colorant d'hématoxyline. Puis les lames sont rincées 3 x 5 min avec de l'eau du robinet avant d'être plongées pendant 1 min dans le colorant éosine. Puis les lames sont successivement incubées dans 70% (v/v) éthanol pendant 2 min, dans 95% (v/v) éthanol pendant 2 x 2 min, puis dans 100% éthanol pendant 2 x 2 min. Enfin, elles sont incubées 2 x 2 min dans du xylène et sont montées avec une goutte de milieu de montage DPX sous lamelle et scellées avec du vernis à ongle.

#### IV.5.5. Détection des inclusions d'ubiquitin (Ub) et de polyglutamine (PolyQ)

Le tissu d'intérêt, inclus dans un bloc de paraffine, est découpé au microtome en section d'épaisseur 7  $\mu\text{m}$ . Les lames sont chauffées à 60°C pendant 30 min pour faire fondre la paraffine. Puis elles sont incubées dans du xylène pendant 2 x 3 min et dans 100% éthanol pendant 2 x 2 min. Un blocage est réalisé pendant 30 min sous agitation dans 0.3% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans du méthanol à TA. Ensuite, les lames sont réhydratées dans les bains successifs suivants :

Protocole détection des PolyQ	Protocole détection des inclusions d'Ub
100% éthanol, 2 x 2 min 95% éthanol, 2 x 2 min 80% éthanol, 2 x 2 min 70% éthanol, 1 x 2 min 50% éthanol, 1 x 2 min H <sub>2</sub> O, 2 x 2 min	100% éthanol, 2 x 2 min 95% éthanol, 2 x 2 min 90% éthanol, 2 x 2 min 80% éthanol, 1 x 2 min 50% éthanol, 1 x 2 min 30% éthanol, 1 x 2 min H <sub>2</sub> O, 2 x 2 min

**Tableau IV.2. Bains d'éthanol successifs pour la réhydratation des lames** pour la détection des agrégats PolyQ (panneau de droite) et des inclusions d'Ub (panneau de gauche).

Puis les lames sont incubées dans 10 mM de citrate Tris sodium/0.05% (v/v) Tween 20 dans H<sub>2</sub>O, pH 6, pendant 30 min au micro-onde en jouant avec la puissance pour être toujours à la limite de l'ébullition. Puis, les lames sont refroidies à TA pendant 30 min. Elles sont ensuite rincées 2 x 2 min dans du PBS 1X, incubées pas plus de 4 min dans de l'acide formique puis rincées à nouveau 3 x 2 min dans du PBS 1X. Les lames sont alors bloquées pendant 1 h à TA avec 10% (v/v) NGS dans du PBS 1X puis incubées avec l'anticorps correspondant (Tableau II.5.) sur la nuit à 4°C. Elles sont ensuite rincées 3 x 5 min avec du PBS 1X, incubées 1 h à TA avec l'anticorps secondaire (Tableau II.6.) et rincées 3 x 5 min avec du PBS 1X. Le signal est révélé par l'utilisation du kit Liquid DAB+ Substrate pendant 5 min. Les lames sont ensuite rincées 2 x 2 min dans de l'eau et colorées pendant 10 min avec de l'hématoxyline avant d'être rincées 3 x 5 min avec de l'eau du robinet.

Ensuite, les lames sont incubées dans les bains successifs suivants :

Protocole détection des PolyQ	Protocole détection des inclusions Ub
70% éthanol, 2 min 95% éthanol, 2 min 100% éthanol, 2 x 2 min Xylène, 3 x 2 min	30% éthanol, 5 min 70% éthanol, 5 min 95% éthanol, 5 min 100% éthanol, 5 min Xylène, 3 x 5 min

**Tableau IV.3. Bains d'éthanol successifs pour la déshydratation des lames** pour la détection des agrégats PolyQ (panneau de droite) et des inclusions d'Ub (panneau de gauche).

Puis, les lames sont montées avec une goutte de milieu de montage DPX sous lamelle et scellées avec du vernis à ongle.

#### IV.5.6. Coloration des corps de Nissl

Le tissu d'intérêt, inclus dans un bloc de paraffine est découpé au microtome en section d'épaisseur 7 µm. Les lames sont chauffées à 60°C pendant 30 min pour faire fondre la paraffine. Puis les lames sont incubées dans du xylène pendant 2 x 3 min, puis dans 100% éthanol pendant 2 x 2 min et dans de 70% éthanol pendant 2

min. 300  $\mu$ L du colorant Cresyl violet du kit LCM (laser capture microdissection) staining sont déposés sur chaque lame pendant 45 sec et les lames sont immédiatement rincées dans les bains suivants (sans agitation pour éviter une perte complète du marquage) : 70% éthanol, 2 min ; 95% éthanol, 2 x 2 min ; 100% éthanol, 2 x 2 min ; xylène, 3 x 2 min. Puis elles sont montées avec une goutte du milieu de montage DPX sous lamelle et scellées avec du vernis à ongle.

#### **IV.5.7. Détection de l'apoptose (TUNEL assay)**

Un kit de détection de la mort cellulaire in situ (*In Situ* Cell Death Detection Kit, POD) a été utilisé. Son système est basé sur le TUNNEL assay, et permet donc la détection de la fragmentation ADN résultant de l'apoptose. Le tissu d'intérêt est découpé au cryostat à une épaisseur de 7  $\mu$ m. Les lames sont ensuite séchées pendant 30 min à TA, puis fixées pendant 15 min au 4% (w/v) PAF dans PBS 1X à TA. Elles sont rincées 5 x 2 min dans du PBS 1X, puis bloquées dans 3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans du méthanol pendant 10 min à TA, et lavées dans du PBS 1X pendant 3 x 5 min. Les lames sont ensuite perméabilisées avec 0.1% (v/v) Triton X-100 dans 0.1% citrate de sodium pendant 2 min sur glace. Les lames sont alors rincées dans du PBS 1X. La lame qui servira de contrôle positif est incubée pendant 10 min avec de la DNase I. Chaque lame est ensuite incubée avec 50  $\mu$ L du mix « Label solution/Enzyme solution » pendant 30 min à 37°C dans une atmosphère humide. La lame qui servira de contrôle négatif est uniquement incubée avec 50  $\mu$ L de « Label solution ». Les lames sont ensuite rincées 3 x 2 min dans du PBS 1X et peuvent être montées et observées comme décrit dans la section IV.5.6.

### **IV.6. Cultures cellulaires, transfection et infection**

#### **IV.6.1. Cultures primaires d'astrocytes et de neurones**

Suite à l'accouplement, un bouchon vaginal (*plug*) est présent chez les femelles. La présence de ce bouchon nous indique le premier jour de la fécondation, si elle a eu lieu. Par ce système, l'âge *in utero* des embryons est calculé. Ainsi, les femelles grosses de 16.5 jours sont récupérées et tuées par dislocation cervicale. Les embryons sont récupérés, incubés dans la solution de Leibovitz's L-15 sur de la glace pendant 5 min. Chaque embryon est ensuite décapité et le cerveau entier est isolé dans un puit d'une plaque de 12 puits contenant 800  $\mu$ L de la solution de Leibovitz's L-15 sur de la glace. Pour chaque embryon, une biopsie de queue est réalisée pour

effectuer ultérieurement un génotypage. Avec l'aide d'une loupe binoculaire, toutes les méninges sont retirées et le cerveau est remis dans un nouveau puit avec 800  $\mu$ L de la solution de Leibovitz's L-15. Chaque cerveau est ensuite transféré à l'aide d'une pipette P1000 dans 1 mL de solution HBSS, dans un tube d'1mL. La solution HBSS est retirée de façon à toujours laisser les cerveaux en solution, et 1 mL de solution ATV préchauffée à 37°C est ajouté. Les tissus sont aspirés deux fois au travers d'une pipette P1000, puis incubés pendant 20 min à 37°C où ils sont secoués toutes les 5 min. Ils sont ensuite lavés deux fois avec 1 mL de solution HBSS puis 0.2 mg/mL de DNase est ajouté afin de faciliter la dissociation du tissu. Les cerveaux sont doucement secoués pour séparer tous les morceaux. Après une incubation de 5 min à TA, ils sont lavés deux fois avec 1 mL de solution d'HBSS, puis gardés dans 1 mL de milieu neuronal ou de milieu astrocytaires selon le type cellulaire voulu.

Pour obtenir une culture de neurones primaires, 300 à 500 mL (en fonction du nombre d'embryons) du milieu neurobasal sont extemporanément préparés et passés sur un filtre 0.45  $\mu$ m. Le tissu est ensuite passé deux fois à travers une aiguille de calibre 21 G et deux fois à travers une aiguille de calibre 25 G. Les tissus sont laissés en sédimentation pendant au moins 3 min mais pas plus de 5 min. Le surnageant est alors récupéré et centrifugé 4 min à 300 g. Le culot est resuspendu avec 1 mL de solution neurobasale. Après un comptage des cellules, ces dernières sont mises en culture dans une atmosphère humide, stérile, à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, sur le support désiré préalablement coaté avec un mélange de 0.1 mg/mL de poly-D-lysine et 20  $\mu$ g/mL laminin dans de l'eau filtrée, désionisée et stérilisée.

Pour obtenir une culture d'astrocytes primaires, le tissu est resuspendu dans 1 mL de solution astrocytaire. Le tissu est ensuite resuspendu deux fois à travers une aiguille de calibre 21 G et trois fois à travers avec une aiguille de calibre 25 G. Après un comptage des cellules, ces dernières sont mises en culture comme décrit ci-dessus.

#### **IV.6.2. Cultures de lignées cellulaires**

Les différentes lignées cellulaires utilisées pour mes travaux de thèse ont toutes été cultivées dans une atmosphère humide, stérile, à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Pour chaque passage, les cellules sont lavées avec du PBS 1X, et incubée avec 1mL 0.05% Trypsine-EDTA. Puis, les cellules détachées du support sont récupérées dans 4 mL de leur milieu respectif et centrifugées à 600 g pendant 5 min. Le culot est resuspendu dans 1 mL de milieu, et une fraction cellulaire est remise en culture sur le support approprié.



### IV.6.3. Transfection

Le kit de transfection utilisé se constitue de la lipofectamine LTX et le réactif Plus-Reagent (Lipofectamine® LTX & Plus Reagent). Le plasmide à transférer est préalablement dilué dans le milieu Opti-MEM (Opti-MEM® I Reduced Serum Medium) et gentiment mixé. Puis, le Plus-Reagent est ajouté, mixé, et incubé avec le plasmide pendant 5 min à TA. Enfin, la lipofectamine LTX est ajoutée et le tout est incubé pendant 30 min à TA. Avant de déposer le mix de transfection sur les cellules, le milieu de culture est changé. Les quantités des réactifs de transfection et des plasmides changent en fonction de la surface de la boîte de culture (Tableau IV.4.). Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 h.

Boîte de culture	Surface (cm <sup>2</sup> )	milieu Opti-MEM	Plasmide	LTX	Plus-Reagent
Boîte 100mm	60	500 mL	12 µg	42 µL	12 µL
Plaquette de 6 puits	10	100 mL	2 µg	10 µL	2 µL
Chambre à 8 puits	0,5	50 mL	100 ng	0.5 µL	0.1 µL

**Tableau IV. 4. Quantités des réactifs de transfection et des plasmides en fonction de la surface de la boîte de culture**

### IV.6.4. Infection virale

Les cultures primaires d'astrocytes sont infectées par une construction tronquée de MBNL1, appelée MBNL1ΔCtr, étiquetée avec la protéine GFP (GFP-MBNL1ΔCter), ou par EGFP. Pour cette expérience, trois puits d'une surface de 10 cm<sup>2</sup> pour récupérer l'ARN, trois puits d'une surface de 10 cm<sup>2</sup> pour récupérer les protéines, et trois puits d'une surface de ~0.5 cm<sup>2</sup> pour une expérience de FISH sont nécessaires par embryon. Trois embryons de chaque génotype [non-transgénique (NT), hémizygoté (hémi) et homozygoté (homo)] ont été mis en culture à hauteur de 20 000 cellules/cm<sup>2</sup>, deux jours avant la transduction. Le jour de la transduction (J0), les cellules sont cultivées dans leur milieu de culture sans antibiotiques. 150 ng de virus sont dilués dans 500 µL par puit pour permettre un meilleur contact avec les cellules. 50 ng sont utilisés pour les puits de la chambre. Les cellules sont ensuite incubées à 33°C pendant 30 min, puis à 37°C pendant 3 h. Au bout de ce temps, une deuxième transduction est réalisée, identique à la première. Les cellules sont alors incubées pendant 1 h à 37°C et 2 mL de milieu complet sont ajoutés sans retirer le milieu de transduction. Après 72 h d'incubation, l'ARN ou les protéines sont extraits. Une FISH est réalisée en parallèle sur les puits de la chambre.

#### IV.7. Mesure du flux calcique

Des astrocytes primaires des trois génotypes (NT, hémi et homo) sont ensemencés sur des microplaques noires de 24 puits. Le jour de la mesure calcique, le milieu de culture est retiré et les cellules sont chargées avec 4  $\mu\text{M}$  de la sonde fluorescente Fluo-4 AM (resuspendue dans du DMSO) dans 500  $\mu\text{L}$  du milieu astrocytaire, pendant 45 min à 37°C dans l'étuve. Les cellules sont alors rincées deux fois 500  $\mu\text{L}$  par une solution HBSS pour mesure calcique.

La sonde calcique Fluo-4 permet de suivre les variations de la concentration cytosolique en calcium libre,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , grâce à l'émission de lumière à 515 nm après excitation à 485 nm. Brièvement, lorsque la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  augmente, la lumière émise par la sonde fluorescence augmente et cette augmentation peut être traduite en variations de calcium par la relation suivante:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = Kd * (F-Fmin)/(Fmax-F)$$

- avec 345 nM comme Kd du Fluo-4/ $\text{Ca}^{2+}$  (déterminé par le fournisseur)
- *Fmax*, l'intensité maximale de fluorescence du signal mesurée après addition de 5  $\mu\text{M}$  de digitonine en présence de 6 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . La digitonine permet de faire entrer une concentration saturante en calcium dans la cellule et *F max* correspond à la valeur quand la sonde calcique est saturée en calcium. La digitonine est un détergent membranaire qui, à cette concentration, n'affecte que les membranes riches en cholestérol et laisse les membranes internes intactes.
- *Fmin*, l'intensité minimale suite à l'ajout de 50 mM EGTA pH 7.3. Ceci correspond à la valeur quand la sonde calcique est totalement libre de calcium.
- *F* la fluorescence du signal émis par les cellules

#### IV.8. Microdissection Capture Maser (LCM)

Le cervelet microdisséqué est plongé dans de l'isopentane à -20°C puis transféré à -80°C. Des coupes d'une épaisseur de 7  $\mu\text{m}$  sont réalisées au cryostat. Les cellules de Purkinje ou les cellules autour de ces dernières sont microdisséquées avec un laser microdissecteur (Palm beam, Carl Zeiss microscopy). Les cellules découpées sont catapultées dans des tubes AdhesiveCap 500 clear et stockées dans de la carboglace jusqu'à la fin des coupes. Les cellules sont ensuite resuspendues avec 5

$\mu\text{L}$  de PBS 1X et lysées pendant 2 min à 65°C puis stockées à 10°C. Le protocole comprend une première étape de transcription inverse (Tableau IV.5.), puis deux PCR successives (Tableau IV.6. et IV.7.). Le design des oligonucléotides (Tableau II.4) doit respecter plusieurs règles (Peixoto et al., 2004).

La transcription inverse (RT) est réalisée comme indiqué dans le tableau IV.5 ci-dessous. Les tubes sont incubés pendant 1 h à 37°C, suivie d'une étape à 95°C pendant 3 min.

Produit	Quantité
Cellules lysées	5 $\mu\text{L}$
MMLV	11.5 U
RNAsin	39 U
Amorce 3 (5 $\mu\text{M}$ )	0.13 $\mu\text{M}$
dNTPs (10 mM chacun)	1 mM chacun
MgCl <sub>2</sub>	3.33 mM
PCR buffer II (10x)	1X
qsp H <sub>2</sub> O (nuclease free)	10 $\mu\text{L}$

**Tableau IV.5 Condition de réaction de la transcription inverse**

La première PCR (PCR1) se réalise comme indiquée dans le tableau IV.6., pendant n= 28 cycles avec l'étape de dénaturation à 95°C pendant 5 min, puis (dénaturation à 94°C pendant 45 sec – hybridation à 60°C pendant 1 min – élongation à 72°C pendant 1.5 min)<sub>n</sub> suivie d'une étape de 10 min d'élongation à 72°C.

Produit	Quantité
ADNc	15 $\mu\text{L}$
Taq	3 U
Amorce 1 (5 $\mu\text{M}$ )	0.015 $\mu\text{M}$
Amorce 3 (5 $\mu\text{M}$ )	0.015 $\mu\text{M}$
dNTPs (2.5 mM chacun)	0.2 mM chacun
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
PCR buffer II (10x)	1X
qsp H <sub>2</sub> O (nuclease free)	70 $\mu\text{L}$

**Tableau IV.6. Condition de réaction de la PCR1**

La seconde PCR (PCR2) se réalise comme indiquée dans le tableau IV.7. Suite à la première étape de dénaturation à 95°C pendant 5 min, cette PCR2 se compose d'une succession de cycles : 2 x (dénaturation à 94°C pendant 30 sec – hybridation à 60°C pendant 45 sec – élongation à 72°C pendant 1 min), 2 x (dénaturation à 94°C pendant 30 sec – hybridation à 66°C pendant 45 sec – élongation à 72°C pendant 1 min), 2 x (dénaturation à 94°C pendant 30 sec – hybridation à 62°C pendant 45 sec – élongation à 72°C pendant 1 min), 40 x (dénaturation à 94°C pendant 30 sec – hybridation à 60°C pendant 45 sec – élongation à 72°C pendant 1 min) et suivie d'une étape de 10 min d'élongation à 72°C.

Produit	Quantité
Produit de la PCR 2	2 $\mu$ L
Taq	0.5 U
Amorce 2 (5 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ M
Amorce 3 (5 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ M
dNTPs (2.5 mM chacun)	0.25 mM chacun
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
PCR buffer II (10x)	1X
qsp H <sub>2</sub> O (nuclease free)	18 $\mu$ L

Tableau IV.7. Condition de réaction de la PCR2

#### IV.9. Quantification globale protéomique : iTRAQ (Etiquette isobarique pour quantification absolue et relative)

Les protéines utilisées pour cette étude protéomique ont été extraites comme décrit dans la section IV.4.6. 100  $\mu$ g de protéines sont précipitées en ajoutant 6 volumes d'acétone, et incubés à  $-20^{\circ}\text{C}$  sur toute la nuit. Puis, le mélange est centrifugé à 13 000 g à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 15 min. Le surnageant est éliminé et les culots séchés à l'air libre. La suite du protocole utilise les réactifs du kit iTRAQ (iTRAQ<sup>TM</sup> Reagent Multiplex Kit). Le culot est repris dans 20  $\mu$ L de 500 mM de TEAB (triethylammonium bicarbonate) et 1  $\mu$ L de SDS 2%. Les protéines sont ensuite réduites avec 2  $\mu$ L de 50 mM TCEP [tris-(2-carboxyethyl) phosphine] pendant 1 h à  $60^{\circ}\text{C}$  et finalement alkylées avec 1  $\mu$ L de 200 mM de MMTS (methyl methanethiosulfonate) pendant 10 min à RT. Les protéines sont alors digérées avec 10  $\mu$ L de trypsine 1  $\mu$ g/ $\mu$ L sur toute la nuit à  $37^{\circ}\text{C}$  sous agitation. Les peptides résultant de la digestion sont alors marqués avec les réactifs du kit iTRAQ. Chaque réactif (marqueur) est resuspendu dans 70  $\mu$ L éthanol, ajouté à un échantillon et incubé 2 h à RT sous agitation. L'arrêt de la réaction de marquage se fait par l'ajout de 100  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O pendant 30 min à RT.

Les échantillons sont ensuite mixés en quantité égale et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Un aliquot de 100  $\mu$ g est ensuite purifié avec le système cation exchange cartridge SCX (Cleavable ICAT<sup>®</sup> Reagent Kit) puis élués dans 500  $\mu$ L de 350 mM de chlorure de potassium, 25% (v/v) acetonitrile et évaporés dans un SpeedVac. Les échantillons sont resuspendus dans 0.1% (v/v) d'acide trifluoroacetic et déposés sur un Sep-Pak cartridge (Waters) pour un dessalement. Après un lavage, les peptides sont élués dans 1 mL de 70% (v/v) acetonitrile/0.1% (v/v) d'acide trifluoroacetic et séchés dans un centrifuge sous vacuum.

L'analyse Nano-LC-MS/MS est faite sur le système Ultimate 3,000 Rapid Separation Liquid Chromatography (RSLC) (Dionex) couplé au spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Les peptides séchés sont resuspendus dans 0.1% (v/v) d'acide trifluoroacetic, de 10% acetonitrile, et preconcentrés sur une pré-colonne (à phase inversée) de 75  $\mu\text{m}$ . Ils sont ensuite séparés sur un gradient aqueux/organique (solution "A": 0.1% (v/v) d'acide formique dans 5% (v/v) d'acetonitrile; solution "B": 0.085% (v/v) d'acide formique dans 80% (v/v) d'acetonitrile; vitesse d'écoulement 400 nl/min) sur une colonne de 75  $\mu\text{m}$  i.d. RP column (Acclaim PepMap RSLC 75  $\mu\text{m}$  x 15 cm, 2  $\mu\text{m}$ , 100Å, Dionex). Les échantillons sont ensuite élués en utilisant un gradient linéaire de 5% à 40% du solvant B sur 190 min. Un scan FMTS est ensuite réalisé (résolution 60,000; polarité positive, pics détectés en centroïde, balayage dans un intervalle de masse/charge 400 à 2000 m/z) et les 10 signaux les plus intenses sont soumis au fractionnement MS/MS. Les résultats sont transférés sur le logiciel Proteome Discoverer software v1.2 pour créer un fichier .mgf qui va identifier et quantifier les protéines étudiées, à partir d'une recherche chez la souris (*Mus musculus*, 16547 sequence) réalisé sur la base UniprotKB/Swissprot en utilisant le moteur de recherche Mascot search engine (version 2.2.07).

#### IV.10. Analyse statistique

Chaque analyse statistique s'est faite avec le logiciel Excel X 2001 (Microsoft corporation). Quand deux groupes sont comparés, un test statistique de Student a été réalisé. Les différences détectées sont statistiquement significatives seulement lorsque la valeur du  $p$  est inférieure à 0.05. Tous les résultats sont exprimés  $\pm$  l'erreur type sur la moyenne.

## CHAPITRE IV.

# Etude de la splicéopathie dans le système nerveux central d'un modèle murin de la DM1, les souris DMSXL

### **RESUME** |

L'effet *trans*-dominant des répétitions CUG sur l'épissage alternatif explique une partie importante des symptômes de la DM1, notamment dans le muscle. La plupart des études de splicéopathie se sont focalisées sur le tissu musculaire et cardiaque, et moins de choses sont connues pour le SNC. Les souris DMSXL expriment les expansions toxiques CTG dans de nombreux tissus, comme le SNC, et sont un excellent modèle pour étudier la susceptibilité des différentes régions du cerveau à la splicéopathie. L'étude décrite dans ce chapitre montre une susceptibilité variable aux ARNs toxiques dans le cortex frontal, le tronc cérébral, l'hippocampe et la moelle épinière des souris DMSXL. De plus, l'étude de ce modèle à différents âges montre que la majorité des défauts d'épissage se traduit par une augmentation de l'expression des isoformes fœtales à l'âge adulte. Ces résultats montrent que la dérégulation d'un programme d'épissage au cours du développement, démontrée au préalable dans les muscles et le cœur dans la DM1, s'applique aussi au SNC.

Annexe III (Hernandez-Hernandez et al., 2013a)

Annexe IV (Hernandez-Hernandez et al., 2013b)

## I. INTRODUCTION : L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DANS LA DM1

Le mécanisme le plus généralement admis, pour expliquer une partie des symptômes de la DM1, est l'effet *trans*-dominant des répétitions CUG sur l'épissage alternatif. Les ARNs *DMPK* mutés porteurs des expansions CUG interagissent de façon anormale avec des protéines capables de lier le motif CUG de l'ARN. Parmi elles, deux grandes familles régulatrices de l'épissage alternatif au cours du développement: la famille MBNL et la famille CELF. Pendant que les protéines MBNL sont délétées du cytoplasme et du nucléoplasme (Jiang et al., 2004 ; Lin et al., 2006 ; Mankodi et al., 2005), les protéines de la famille CELF, qui ne co-localisent pas avec les foci d'ARN, voient leur expression et leur activité augmentées chez les patients DM1 (Kuyumcu-Martinez et al., 2007 ; Timchenko et al., 1996). Ainsi la dérégulation de ces deux familles de protéines a des conséquences sur les profils d'épissage de transcrits cibles. Ces deux familles, à effets antagonistes, jouent un rôle essentiel dans la transition de l'épissage entre l'âge foetal et l'âge adulte d'un certain nombre de transcrits (Ladd et al., 2001 ; Lin et al., 2006). Les transcrits, spécialement régulés par MBNL et CELF, ont une forte tendance à présenter un profil d'épissage pathologique à l'âge adulte correspondant le plus souvent à un profil d'épissage de type foetal et ce principalement dans les muscles des patients DM1 et des souris transgéniques modèles de la DM1 (Lin et al., 2006 ; Orengo et al., 2008 ; Wang et al., 2007). La plupart des études de la splicéopathie se sont cependant focalisées sur le tissu musculaire et cardiaque.

Plusieurs régions cérébrales ont été étudiées dans la DM1, à l'image du cortex frontal et du tronc cérébral, deux régions présentant des anomalies de structure et histopathologiques et qui sont pertinentes pour les symptômes observés chez les patients DM1. En effet, une perte cellulaire au niveau du tronc cérébral a été rapportée, particulièrement chez les patients souffrant d'hypersomnie excessive et d'hypoventilation (Ono et al., 1995), suggérant que ces symptômes cliniques reflètent une dégénération et/ou une dysfonction des zones du tronc cérébral impliquées dans le contrôle du sommeil. Plus récemment, des études d'imagerie ont révélé des anomalies de structures de la matière grise et blanche dans des régions spécifiques du cerveau, comme le cortex frontal, qui peut alors contribuer à la dysfonction exécutive caractéristique de la DM1 (Minnerop et al., 2011 ; Romeo et al., 2010 ; Weber et al., 2010). Enfin, dans le cerveau des patients DM1, principalement dans le cortex temporal, les transcrits *MAPT/Tau*, *GRIN1/NMDAR1* et *APP* ont été décrits comme étant mal épissés (Jiang et al., 2004). Plus récemment, de nouveaux défauts épissages ont été trouvés, par les techniques de microarray épissage-sensitif et de RNAseq, sur l'hippocampe de souris déficientes pour *Mbnl2* (Charizanis et al., 2012).



Certains de ces défauts ont été validés dans différentes régions du cerveau des patients DM1, à l'image de l'hippocampe.

La susceptibilité des différentes régions du cerveau aux ARNs toxiques et la distribution régionale de la splicéopathie dans le SNC sont méconnues. De plus, il reste aussi à étudier si le retour de l'épissage, à l'âge adulte, vers une forme d'épissage foetal (hypothèse principalement validée dans les muscles et le cœur dans la DM1) s'applique aussi dans le SNC. Pour l'étude présentée ci-dessous, le modèle murin utilisé est le modèle DMSXL, qui exprime le transgène humain *DMPK* contenant plus de 1000 répétitions CTG dans différents tissus. Ce modèle à l'avantage entre autres d'exprimer les expansions toxiques CTG dans le SNC, permettant ainsi une étude détaillée de la splicéopathie sur plusieurs régions cérébrales, mais aussi à différents âges.

La sélection des régions cérébrales pour cette étude s'est basée sur la quantité des accumulations toxiques ribonucléaires ainsi que sur la pertinence symptomatique pour la DM1 de chaque région. Selon une précédente analyse réalisée sur le cerveau des souris DMSXL, des foci d'ARN ont été retrouvés dans la majorité des régions du SNC avec cependant des différences régionales (Hernandez-Hernandez et al., 2013a). En effet, plus de 70 % des cellules ont montré la présence de foci dans le cortex ainsi que dans certains noyaux du tronc cérébral. Ces deux régions ont été sélectionnées aussi parce qu'elles sont impliquées dans des processus altérés chez les patients DM1 : le cortex frontal est impliqué dans des tâches exécutives (Robbins and Arnsten, 2009) et le tronc cérébral est en partie responsable du contrôle des cycles du sommeil et de la fonction cardiaque (Izac and Eeg, 2006). J'ai également étendu mon étude à l'hippocampe, connu pour être impliqué dans les fonctions de mémoire et d'apprentissage (Buzsaki and Moser, 2013 ; Pastalkova et al., 2006), altérées chez les patients DM1 (Kobayakawa et al., 2012 ; Meola et al., 2003 ; Winblad et al., 2005). La moelle épinière a aussi été incluse dans l'analyse car c'est une région qui amène l'information entre autres aux muscles, affectés dans la pathologie, mais aussi parce que sa susceptibilité à la toxicité de l'ARN *DMPK* est méconnue.

## **II. RESULTATS**

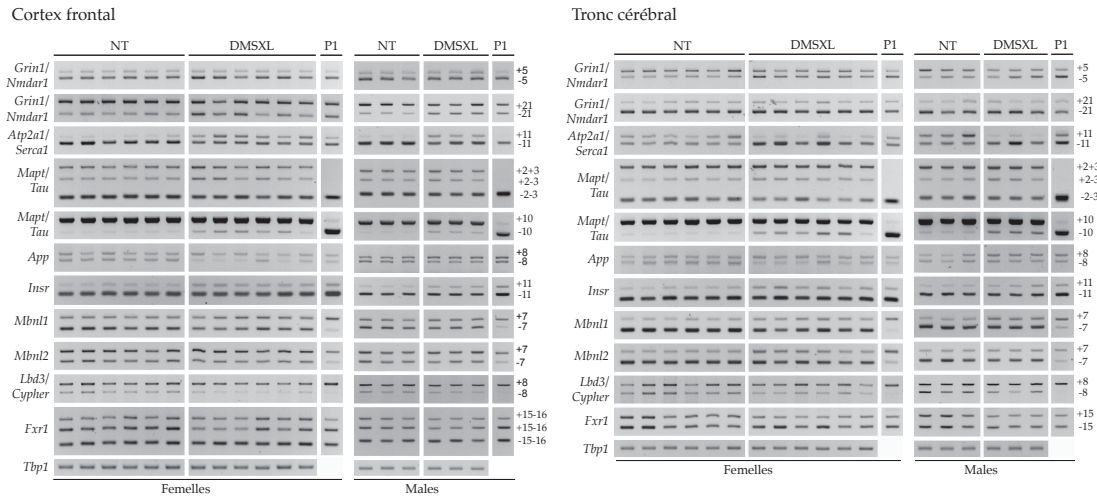
Les résultats présentés et discutés ci-dessous font partie des deux articles publiés récemment (Hernandez-Hernandez et al., 2013a ; Hernandez-Hernandez et al., 2013b). Je suis première co-auteur d'un de ces deux articles.

### **II.1. Epissage alternatif dans le SNC des souris DMSXL à l'âge d'un mois**

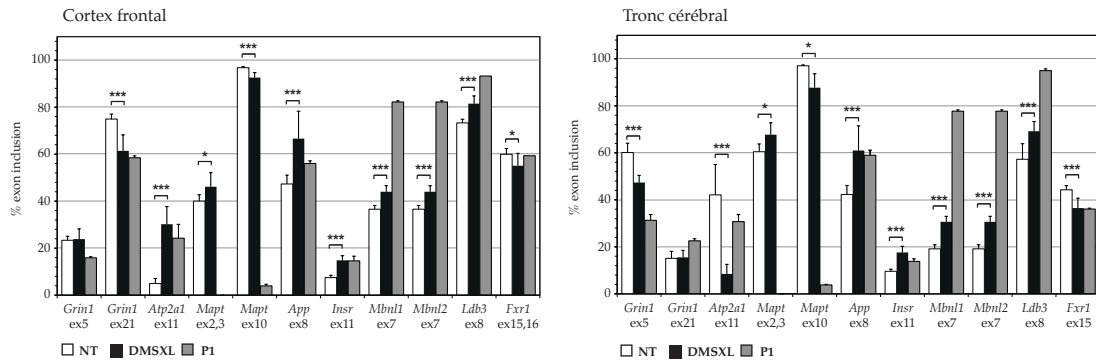
#### **II.1.1. Le cortex frontal et le tronc cérébral**

Cette section présente les résultats des défauts d'épissage dans le cortex frontal et le tronc cérébral des souris DMSXL. L'analyse pour ces deux régions cérébrales est plus extensive que les autres régions de part leur grand nombre de foci ainsi que de leurs possibles implications dans la neuropathologie de la DM1. L'épissage alternatif de gènes candidats a été exploré dans le cortex frontal et le tronc cérébral des souris DMSXL homozygotes (n=9) comparé aux souris contrôles non-transgéniques (n=9) à l'âge d'un mois (Figure II.1.). L'analyse s'est portée sur des gènes connus pour être dérégulés dans le cerveau ainsi que dans les muscles des patients DM1 (Jiang et al., 2004 ; Kimura et al., 2005 ; Savkur et al., 2001).

**A**



**B**



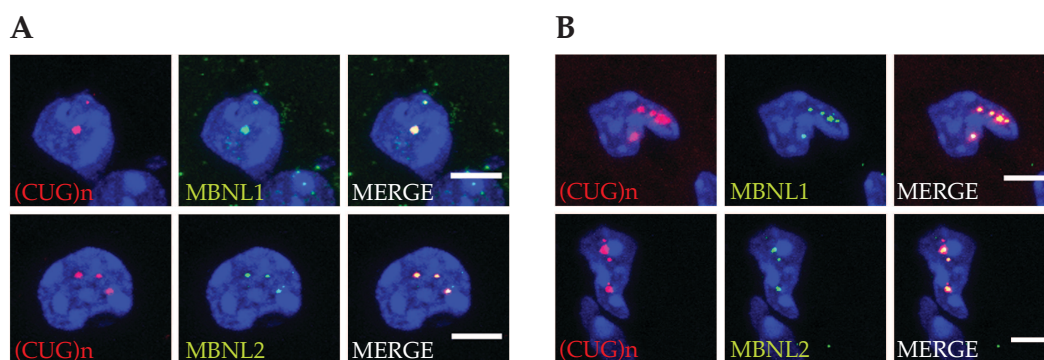
**Figure II.1. Etude de l'épissage alternatif dans le cortex frontal et le tronc cérébral des souris DMSXL homozygotes et des souris contrôles non-transgéniques à l'âge d'un mois. (A) Analyse des produits de RT-PCR (n=9 pour chaque génotype). P1 correspond à un pool de 3 souris contrôles au stade postnatal d'un jour. (B) Quantification des pourcentages d'inclusion des exons alternatifs des transcrits ARNm codant pour *Grin1/Nmdar1*, *Atp2a1/Serca1*, *Mapt/Tau*, *App*, *Insr*, les facteurs impliqués dans la régulation de l'épissage *Mbnl1* et *Mbnl2*, *Ldb3/Cypher* et *Fxr1* (\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.01$ ). *Tbp1* a été utilisé comme contrôle interne. Les résultats sont présentés  $\pm$  l'erreur type sur le moyenne.**

Des défauts d'épissage ont été détectés dans les deux régions cérébrales des souris DMSXL homozygotes. De manière intéressante, l'épissage alternatif des exons 5 et 21 du gène *Grin1/Nmdar1* est altéré de manière région spécifique entre le cortex frontal et le tronc cérébral des souris DMSXL. En effet, alors que l'exon 5 montre une exclusion anormalement élevée dans le tronc cérébral, l'exon 21 est anormalement exclu dans le cortex frontal des souris DMSXL. Il semblerait donc que le mécanisme à l'origine de ces défauts d'épissage soit régulé de manière tissu spécifique. Egalement, il est envisageable de penser que le retour pathologique du profil d'épissage à l'âge adulte vers un profil d'épissage fœtal, principalement décrit dans les muscles (Lin et al., 2006 ; Orengo et al., 2008 ; Wang et al., 2007), soit vrai pour la majorité des gènes étudiés. En effet, le profil observé dans le cortex frontal et le tronc cérébral des souris DMSXL tend à se rapprocher (bien que de façon limitée) de celui observé dans les souris non-transgéniques à l'âge d'un jour postnatal (P1). Cette hypothèse ne

s'applique pas au défaut d'épissage observé pour les exons 2 et 3 du transcrit *Mapt/Tau*. En effet, une augmentation de l'inclusion est observée dans les deux régions cérébrales étudiées des souris DMSXL comparée au profil des souris non-transgéniques à l'âge adulte ; alors que dans les souris non-transgéniques à l'âge d'un jour postnatal, ces deux exons sont totalement exclus. Il en est de même pour l'exon 22 du transcrit *Atp2a1/Serca1*, dont l'exclusion anormale dans le tronc cérébral des souris DMSXL ne reproduit pas la situation observée chez les souris non-transgéniques âgées d'un jour postnatal.

Aucune différence significative n'a été observée entre les males et les femelles. En effet, les défauts d'épissage observés dans le cortex frontal et tronc cérébral ne semblent pas être plus sévères dans un sexe que dans l'autre, suggérant que la susceptibilité aux ARNs toxiques soit similaire entre les males et les femelles DMSXL.

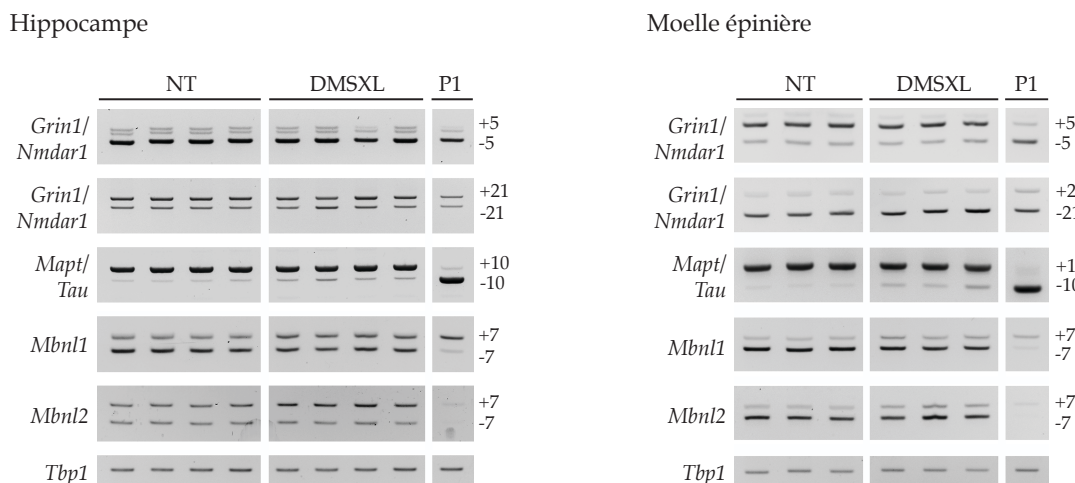
Enfin, plusieurs transcrits, connus pour être spécifiquement régulés par MBNL1, présentent des défauts d'épissage à l'image de l'exon 7 du transcrit *Mbnl1* et l'exon 11 du transcrit *Ldb3* (Kalsotra et al., 2008). Ces résultats suggèrent une perte de fonction des protéines MBNL sur la dérégulation de l'épissage alternatif dans les régions du cortex frontal et du tronc cérébral. La co-localisation de MBNL1 et MBNL2 aux foci d'ARN, dans le cortex frontal et cérébral, a été démontrée par des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunofluorescence (Figure II.2.). De manière similaire, un défaut d'épissage plus modeste des exons 15 et 16 du transcrit *Fxr1*, connus pour être régulés par CELF1, dans le cortex frontal et le tronc cérébral, prédit un rôle de la dérégulation des protéines CELF dans la splicéopathie du SNC, confirmée par la surexpression de cette protéine (Hernandez-Hernandez et al., 2013a).



**Figure II.2. Accumulation nucléaire de foci d'ARN associée à la séquestration des protéines MBNL1 et MBNL2, (A) dans le cortex et (B) le tronc cérébral des souris DMSXL homozygotes âgées d'un mois.** Les foci d'ARN *DMPK* (rouge) ont été détectés par hybridation fluorescente *in situ* (FISH) associée à une immunofluorescence pour MBNL1 ou MBNL2 (vert). La barre d'échelle correspond à 5µm.

### II.1.2. L'hippocampe et la moelle épinière

Une étude similaire de la splicéopathie a été réalisée sur l'hippocampe et la moelle épinière des souris DMSXL et des souris contrôles non-transgéniques, à l'âge d'un mois (Figure II.3). La liste des gènes testés s'est restreinte à ceux présentant les défauts d'épissage les plus sévères dans le cortex frontal et le tronc cérébral ainsi que les défauts décrits dans le cerveau des patients DM1 (Jiang et al., 2004).



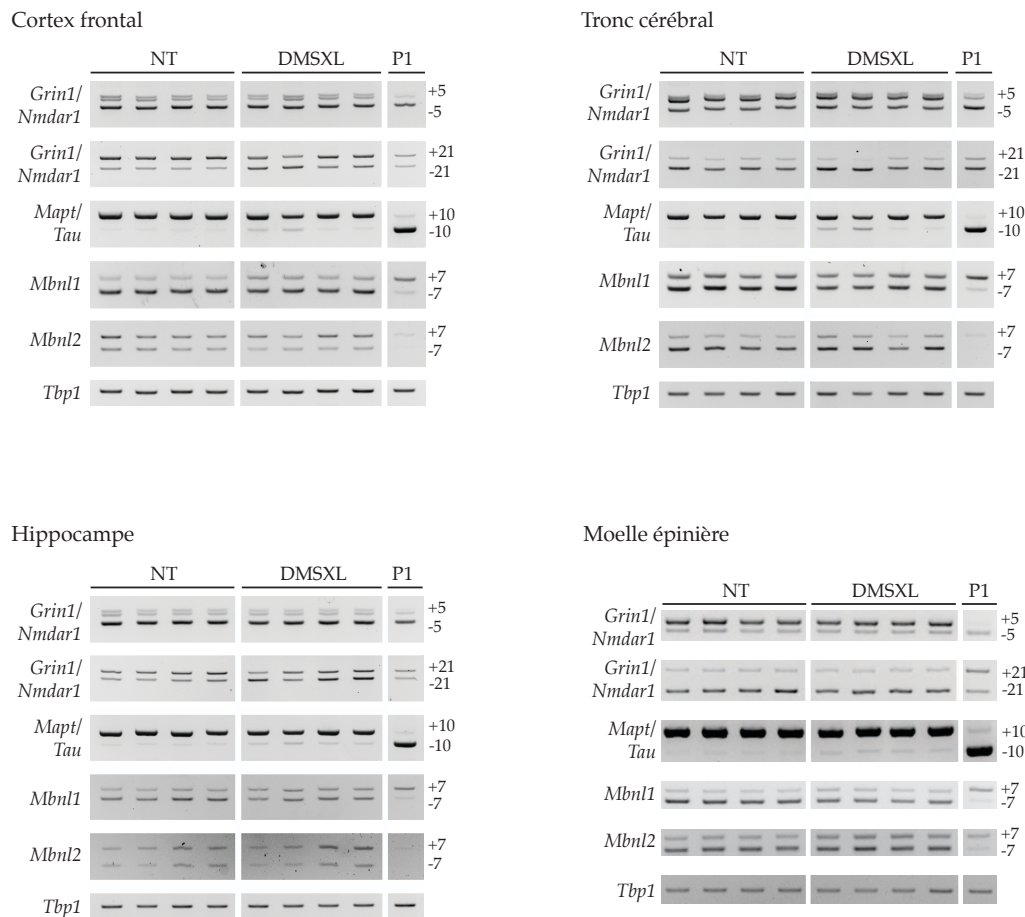
**Figure II.3. Etude de l'épissage alternatif dans l'hippocampe et la moelle épinière des souris DMSXL homozygotes à un mois.** Analyse des produits de RT-PCR de l'épissage alternatif des exon 5 et 21 de *Grin1/Nmdar1*, de l'exon 10 de *Mapt/Tau* et de l'exon 7 de *Mbnl1* et *Mbnl2*. *Tbp* a été utilisé comme contrôle interne. P1 correspond à un pool de 3 souris contrôles au stade postnatal d'un jour. Un nombre différent d'animaux a été étudié dans l'hippocampe (n=4 pour chaque génotype) et moelle épinière (n=3 pour chaque génotype). *Tbp* a été utilisé comme contrôle interne.

Les défauts d'épissage concernant ces deux régions sont plus modestes et plus variables que dans le cortex frontal et le tronc cérébral, à l'image du défaut d'épissage de l'exon 21 du transcrite *Grin1/Nmdar1* détecté de façon marquée chez un individu sur quatre dans l'hippocampe. Aucune différence significative de l'inclusion de l'exon 5 n'a été observée dans l'hippocampe ou la moelle épinière des souris DMSXL. Une augmentation de l'inclusion de l'exon 7 des transcrits *Mbnl1* et *Mbnl2* est observée dans l'hippocampe des souris DMSXL, mais aussi dans la moelle épinière de manière plus modeste. Enfin, le défaut d'épissage de l'exon 10 de *Mapt/Tau* est également consistant dans ces deux régions cérébrales. Comme pour la majorité des gènes étudiés dans le cortex frontal et le tronc cérébral des souris DMSXL, les défauts d'épissage, certes plus modestes, correspondent à une augmentation modérée de l'expression des isoformes embryonnaires dans l'hippocampe et la moelle épinière des souris DMSXL.

## II.2. Epissage alternatif dans le SNC des souris DMSXL à l'âge de 4 mois

L'étude de la splicéopathie dans les souris DMSXL a également été réalisée sur des souris âgées de 4 mois, afin d'évaluer l'évolution au cours du temps de l'effet *trans*-dominant des expansions CTG sur l'épissage alternatif, qui pourrait expliquer la progression de la maladie avec l'âge (Figure II.4.).

Les régions du cortex frontal, du tronc cérébral, de l'hippocampe et de la moelle épinière ont été analysées sur les souris homozygotes DMSXL (n=4) et les souris contrôles non-transgéniques (n=4) à l'âge de 4 mois (4M) (Figure II.4.). Les défauts d'épissage retrouvés à cet âge chez les souris DMSXL sont d'une manière générale plus modérés et moins fréquents. En effet, l'exon 10 de *Mapt/Tau* est anormalement exclu dans deux souris DMSXL sur quatre au niveau du cortex frontal et du tronc cérébral. Egalement, deux souris sur quatre DMXSL présentent un défaut d'épissage de l'exon 21 de *Grin1/Nmdar1* dans le cortex frontal. L'exon 7 des transcrits *Mbnl1* et *Mbnl2* est observé anormalement épissé dans le cortex frontal et le tronc cérébral des souris DMSXL mais de manière moins sévère qu'à un mois. La situation est similaire pour l'hippocampe et la moelle épinière à quatre mois, à l'exception de l'épissage alternative de l'exon 21 de *Grin1/Nmdar1* dans l'hippocampe qui semble plus prononcé dans les souris plus âgées. Néanmoins, de façon générale, l'ensemble des défauts d'épissage observé à cet âge est plus modéré, à l'image de l'exon 7 de *Mbnl1* et *Mbnl2*, de l'exon 10 de *Mapt/Tau* au niveau de l'hippocampe et de la moelle épinière.



**Figure II.4. Etude de l'épissage alternatif dans le cortex frontal, le tronc cérébral, l'hippocampe et la moelle épinière des souris DMSXL homozygotes et des souris contrôles non-transgéniques à l'âge de 4 mois.** Analyse des profils d'épissage par RT-PCR. P1 correspond à un pool de 3 souris contrôles au stade postnatal d'un jour. Les profils d'épissage de chaque région du SNC ont été étudiés dans 4 souris de chaque génotype. *Tbp1* a été utilisé comme contrôle interne.

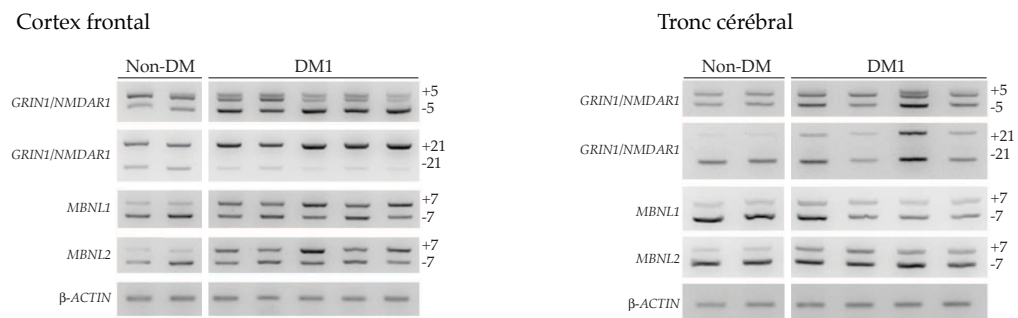
### II.3. Validation chez les patients DM1

Certains transcrits anormalement épissés dans le SNC des souris DMSXL ont déjà été décrits dans le cortex de patients DM1, à l'image de l'exon 5 du transcrit *GRIN1/NMDAR1*, de l'exon 10 de *MAPT/Tau* ou de l'exon 8 de *APP* (Jiang et al., 2004). Par contre, les défauts de l'épissage alternatif des exons 7 de *MBNL1* et *MBNL2*, de l'exon 21 de *GRIN1/NMDAR1* (observés de façon reproductible dans les souris DMSXL) n'ont pas été rapportés dans le cerveau des patients DM1. Basée sur les données obtenues chez les souris DMSXL, j'ai réalisé une analyse de l'épissage alternatif des exons 7 de *MBNL1* et *MBNL2*, de l'exon 21 (et aussi de l'exon 5) de *GRIN1/NMDAR1* dans le cortex frontal et le tronc cérébral de patients DM1 adultes en comparaison avec des contrôles non-DM (Figure II.5.). Cette étude a révélé de manière significative l'inclusion anormale de l'exon 7 des transcrits *MBNL1* et *MBNL2* dans le cortex frontal (n=5) et le tronc cérébral (n=4) de patients adultes DM1, en comparaison avec des individus contrôles non-DM (n=2 pour chacune des

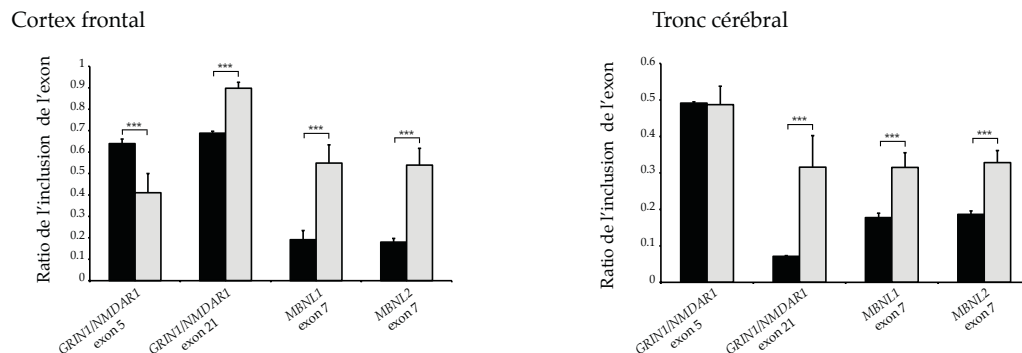


régions). L'inclusion anormale de l'exon 21 de *GRIN1/NMDAR1* est aussi détectée dans le cortex frontal et le tronc cérébral des patients DM1 en comparaison avec les contrôles non-DM. Ces résultats suggèrent donc que les anomalies détectées dans le cerveau des souris DMSXL miment des défauts moléculaires de la DM1. Un défaut d'épissage de l'exon 5 de *GRIN1/NMDAR1* est uniquement détecté dans le cortex frontal des patients DM1, suggérant donc que le mécanisme à l'origine de ce défaut d'épissage soit régulé de manière région spécifique. La spécificité régionale de la splicéopathie a déjà été détectée chez les souris DMSXL. Cependant, alors que le défaut d'épissage de l'exon 5 de *Grin1/Nmdar1* a été spécifiquement détecté dans le tronc cérébral des souris DMSXL, il est spécifiquement détecté dans le cortex frontal humain. Il semblerait donc que la régulation et la susceptibilité région spécifique de certains épissages ne soient pas les mêmes entre la souris et l'homme.

**A**



**B**



**Figure II.5. Etude de l'épissage alternatif dans le cortex frontal et le tronc cérébral de patients DM1 en des individus contrôles non-DM1 (A) Analyse des produits de RT-PCR. (B) Quantification du ratio de l'inclusion des exons alternatifs des transcrits ARNm codant pour le récepteur au glutamate *GRIN1/NMDAR1*, protéine tau (*MAPT/TAU*), et les facteurs d'épissage *MBNL1* et *MBNL2* (\*\*\*)  $p < 0.001$ ). Les ratios d'inclusion correspondent à la moyenne de 5 (cortex frontal) ou 4 (tronc cérébral) individus DM1, et deux individus contrôles non-DM.  $\beta$ -Actin a été utilisé comme contrôle interne. Les résultats sont présentés  $\pm$  l'erreur type sur le moyenne.**

### III. DISCUSSION

Pour explorer la neuropathogénèse de la DM1, j'ai utilisé les souris DMSXL, modèle transgénique de la DM1, qui reproduisent des caractéristiques moléculaires de la pathologie (Hernandez-Hernandez et al., 2013a). En effet, l'expression, entre autres dans le SNC de ces souris, du transgène *DMPK* porteurs de larges expansions CTG résulte en l'accumulation toxique nucléaire de foci d'ARN. Comme dans les muscles squelettiques (Lin et al., 2006 ; Orengo et al., 2008) et cardiaques (Wang et al., 2007), ces inclusions toxiques interfèrent avec l'épissage alternatif régulé au cours du développement dans le SNC, augmentant l'expression des isoformes embryonnaires dans plusieurs régions du SNC des souris DMSXL. En effet, la majorité des défauts d'épissage alternatif décrits dans le cortex frontal, le tronc cérébral, l'hippocampe et la moelle épinière des souris DMSXL reproduit un retour à un profil embryonnaire. Cette observation, associée aux défauts spécifiques de transcrits cibles des facteurs d'épissage MBNL ou CELF (Kalsotra et al., 2008) suggère que la dérégulation de ces deux facteurs de l'épissage alternatif induisent des altérations de l'épissage dans le SNC. La séquestration des protéines MBNL ainsi que la surexpression de CELF dans le cortex frontal et le tronc cérébral confirment le rôle de ces régulateurs de l'épissage dans la splicéopathie observée dans le SNC des souris DMSXL (Hernandez-Hernandez et al., 2013a). En faveur de cette hypothèse, il a été montré que les souris déficientes pour *Mbnl1* ou *Mbnl2* développent des anomalies de l'épissage dans le cerveau (Charizanis et al., 2012 ; Suenaga et al., 2012), qui correspondent à une augmentation anormale de l'expression des isoformes embryonnaires. Il ressort aussi de cette étude que le facteur MBNL2 semblerait avoir un rôle régulateur de l'épissage alternatif plus proéminent dans le cerveau que MBNL1. En parallèle, les souris surexprimant CELF1 de manière inductible dans le cœur et les muscles squelettiques présentent un certain nombre de défauts d'épissage de transcrits, défauts qui correspondent à une augmentation anormale de l'expression des isoformes embryonnaires (Koshelev et al., 2010 ; Ward et al., 2010). Les souris DMSXL présentent une augmentation de l'expression de CELF1 et CELF2 dans le cortex frontal et le tronc cérébral (Hernandez-Hernandez et al., 2013a), suggérant fortement leurs implications dans la dérégulation de l'épissage alternatif dans le SNC. Les souris surexprimant CELF1 de manière inductible représentent un outil potentiel pour étudier le rôle de CELF1 dans le SNC.

Malgré le retour partiel vers un profil d'épissage embryonnaire, les anomalies d'épissage de certains transcrits dans la DM1 ne reproduisent pas un profil fœtal à l'âge adulte. C'est le cas du défaut d'épissage de l'exon 2/3 de *Mapt/Tau*, détecté dans le cerveau des patients DM1 et des souris DMSXL (Dhaenens et al., 2008 ;

Hernandez-Hernandez et al., 2013a), et aussi de l'exon 22 du transcrit *Atp2a1/Serca1* dans le tronc cérébral des souris DMSXL (Hernandez-Hernandez et al., 2013a). Il semblerait donc que certains transcrits soient dérégulés par un effet indirect des expansions CTG, ou bien, soient une conséquence secondaire de la dérégulation de la physiologie intégrale de chaque tissu ou région cérébrale, comme proposé dans le muscle (Orengo et al., 2011).

De manière intéressante, la splicéopathie de la DM1 semble être, pour certains transcrits, région spécifique. En effet, l'exon 5 du transcrit *Grin1/Nmdar1* est anormalement exclu dans le tronc cérébral (et non le cortex frontal) des souris DMSXL alors que l'exon 21 est anormalement exclu du cortex frontal (et non du tronc cérébral) des souris DMSXL. Cela suggère une régulation distincte du mécanisme de l'épissage alternatif, entre les différentes régions du cerveau. En effet, la distribution des isoformes du transcrit *Grin1/Nmdar1* varie entre le cortex frontal et le tronc cérébral chez les souris contrôles. Alors que l'exon 5 est préférentiellement inclus dans le tronc cérébral, il est majoritairement exclu dans le cortex frontal. La situation est opposée pour ce qui concerne l'exon 21. Ces différences suggèrent donc une activité des régulateurs de l'épissage variable selon les régions du cerveau. En effet, le niveau d'expression des protéines CELF1 et CELF2 est plus important dans le cortex frontal que le tronc cérébral de souris contrôles (Hernandez-Hernandez et al., 2013a). Quant aux protéines MBNL, il s'est avéré que leur niveau d'expression était plus important dans le tronc cérébral comparé au cortex frontal (Hernandez-Hernandez et al., 2013a). De plus, les isoformes protéiques de MBNL2 ont montré un profil distinct entre le cortex frontal et le tronc cérébral. Ainsi, l'ensemble de ces différences de niveau d'expression et de distribution des isoformes des régulateurs de l'épissage pourrait contribuer au profil d'épissage région spécifique, et donc à la susceptibilité régionale des exons alternatifs envers la toxicité des accumulations du transcrit ARN porteurs des expansions CUG.

L'analyse de l'épissage alternatif dans le SNC des souris DMSXL à l'âge d'un mois et de quatre mois a montré des différences. En effet, pour la majorité des candidats étudiés, les défauts d'épissage observés sont plus fréquents à l'âge d'un mois. Cela peut s'expliquer par le fait que l'expression du transgène humain *DMPK*, porteur des expansions, n'est pas similaire dans le temps. En effet, l'expression est plus importante dans les souris DMSXL à l'âge d'un mois en comparaison avec les souris DMSXL à l'âge de quatre mois (Huguet, Michel, Gourdon ; résultats non publiés). Egalement, le passage d'un épissage immature fœtal à un épissage mature adulte se produit avec du retard dans les souris DMSXL. Ce *switch* ou transition peut ne pas être complet à l'âge d'un mois alors qu'il l'est à l'âge de quatre mois dans les souris DMSXL. Enfin, il a été décrit une forte mortalité chez les souris DMSXL au

cours du premier mois de vie (Huguet et al., 2012). Par conséquent, il est envisageable de penser que les souris les plus atteintes à l'âge d'un mois (et qui montrent les défauts d'épissage les plus sévères) meurent avant l'âge de quatre mois. Cette étude démontre l'importance de l'âge sélectionné pour l'analyse de la splicéopathie associée à la DM1, et à la vue des résultats présentés, un mois serait une bonne fenêtre temporelle, de part la plus grande fréquence et sévérité des défauts d'épissage et de part la présence d'un pic d'expression maximale du transgène *DMPK*.

L'analyse du métabolisme ARNm de certains transcrits dans le cerveau des souris DMSXL et des patients DM1 a permis de valider que les changements de l'épissage alternatif observés dans les souris DMSXL recréaient des défauts moléculaires spécifiques de la DM1. En effet, que ce soit dans le tronc cérébral et le cortex frontal des souris DMSXL ou des patients DM1, l'exon 7 des transcrits *MBNL1* et *MBNL2* est anormalement inclus. De même, l'exon 5 de *GRIN1/NMDAR1* est anormalement exclu dans le cerveau des souris DMSXL ainsi que dans celui des patients DM1. Cependant, la susceptibilité régionale à la toxicité ARN est différente. En effet, pendant que le défaut d'épissage de l'exon 5 de *Grin1/Nmdar1* est détecté dans le tronc cérébral des souris DMSXL, il est observé dans le cortex frontal des patients DM1. Une autre différence entre les deux espèces est observée sur l'épissage anormal de l'exon 21 de *GRIN1/NMDAR1* : pendant que cet exon montre une inclusion augmentée dans le cerveau des souris DMSXL, c'est une exclusion qui est anormalement élevée dans le cerveau des patients, suggérant un mécanisme de régulation différent entre ces deux espèces pour certains transcrits. Cette divergence de régulation des profils d'épissage entre l'homme et la souris a déjà été observée pour l'exon 11 de *INSR* (Guiraud-Dogan et al., 2007), impliqué dans la dérégulation du métabolisme de l'insuline. Il est donc important de garder à l'esprit que la régulation de l'épissage de certains transcrits peut varier entre espèces, même en situation normale, non pathologique.

Comprendre le mécanisme à l'origine de ces défauts d'épissage est primordial pour pouvoir développer des stratégies thérapeutiques pour prévenir ces défauts d'épissage ; mais connaître les conséquences de ces défauts l'est tout autant pour cibler les intermédiaires en aval et tenter de limiter l'effet délétère de la splicéopathie. Cependant, nous ne connaissons pas précisément l'impact fonctionnel des défauts d'épissage des transcrits *Grin1/Nmdar1* et *Mapt/Tau*. Il a été montré que les souris déficientes pour *Mbnl2* développent des anomalies d'apprentissage suite à l'exécution d'une tâche dépendante de l'hippocampe, une baisse de la transmission synaptique médiée par l'activité de NMDAR1 et des anomalies de la plasticité synaptique de l'hippocampe (Charizanis et al., 2012). La dérégulation de l'épissage

de *Grin1/Nmdar1* dans ces souris pourrait donc contribuer à ces événements. Ainsi, il est légitime de penser que les anomalies d'épissage observées pour *Grin1/Nmdar1* dans le SNC des souris DMSXL contribuent au phénotype cognitif (ex : déficits de la mémoire visuospatiale) et électrophysiologique (ex : anomalies de la plasticité à court terme) de ces souris. De plus, chez les patients DM1, le défaut d'épissage de l'exon 5 de *GRIN1/NMDAR1* (Jiang et al., 2004) pourrait être impliqué dans le déclin des fonctions fronto-temporales incluant la mémoire (Modoni et al., 2008 ; Romeo et al., 2010). De plus amples investigations sont nécessaires pour savoir comment l'épissage anormal de *Grin1/Nmdar1* peut influencer sur sa localisation intracellulaire et/ou sa fonction. Une étude plus approfondie serait également nécessaire pour déterminer l'implication de l'épissage anormal de l'exon 10 de *Mapt/Tau* dans les symptômes du SNC de la DM1.

Enfin, la caractérisation des défauts d'épissage dans les souris DMSXL peut nous amener à identifier des biomarqueurs potentiels pour évaluer l'efficacité d'une stratégie thérapeutique. L'inclusion anormale de l'exon 7 des transcrits *Mbnl1* et *Mbnl2* est parmi les défauts d'épissage les plus reproductibles et les plus robustes dans le cerveau des souris DMSXL. Ils ont été validés dans le cerveau des patients DM1 et constituent donc des candidats intéressants pour être des biomarqueurs pour de futures thérapies qui viseraient à corriger la splicéopathie dans le SNC.

Les souris DMSXL recréent d'importantes caractéristiques phénotypiques et moléculaires de la DM1 au niveau du SNC. En effet, l'accumulation nucléaire toxique du transcrit *DMPK*, porteur des expansions CUG, a été détectée dans le SNC de ces souris DMSXL, qui recréent également une splicéopathie semblable à celle observée chez les patients DM1 (Hernandez-Hernandez et al., 2013a). Elles sont donc un excellent outil pour identifier les régions du cerveau et les voies métaboliques mises à défaut dans la DM1, mais aussi un bon modèle pour tester l'efficacité de futures thérapies sur le SNC. Ainsi, le chapitre V suivant présentera les résultats qui suggèrent une dysfonction particulière d'une région cérébrale dans les souris DMSXL. Le chapitre VI s'attardera sur la possible dérégulation d'une voie métabolique dans le cerveau de notre modèle murin. Enfin, le chapitre VII exposera la validation *in vitro* d'une stratégie thérapeutique dans un modèle cellulaire cérébral dérivée de nos souris transgéniques.

## Myotonic dystrophy CTG expansion affects synaptic vesicle proteins, neurotransmission and mouse behaviour

Oscar Hernández-Hernández,<sup>1,\*</sup> Céline Guiraud-Dogan,<sup>1,2</sup> Géraldine Sicot,<sup>1</sup> Aline Huguet,<sup>1</sup> Sabrina Luillier,<sup>3</sup> Esther Steidl,<sup>4</sup> Stefanie Saenger,<sup>5</sup> Elodie Marciniak,<sup>6</sup> Hélène Obriot,<sup>6</sup> Caroline Chevarin,<sup>7</sup> Annie Nicole,<sup>1</sup> Lucile Revillod,<sup>2</sup> Konstantinos Charizanis,<sup>8,9</sup> Kuang-Yung Lee,<sup>8,9,10</sup> Yasuhiro Suzuki,<sup>11</sup> Takashi Kimura,<sup>11</sup> Tohru Matsuura,<sup>12</sup> Bulmaro Cisneros,<sup>13</sup> Maurice S. Swanson,<sup>8,9</sup> Fabrice Trovero,<sup>3</sup> Bruno Buisson,<sup>4</sup> Jean-Charles Bizot,<sup>3</sup> Michel Hamon,<sup>7</sup> Sandrine Humez,<sup>6</sup> Guillaume Bassez,<sup>2,14</sup> Friedrich Metzger,<sup>5</sup> Luc Buée,<sup>6</sup> Arnold Munnich,<sup>1</sup> Nicolas Sergeant,<sup>6</sup> Geneviève Gourdon<sup>1</sup> and Mário Gomes-Pereira<sup>1</sup>

1 Inserm U781, Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Hôpital Necker-Enfants Malades, 75015 Paris, France

2 Département de Patologie, AP-HP, CHU Henri Mondor, 51 avenue de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France

3 Key-Obs, 13 Avenue Buffon, 45100 Orléans, France

4 Neuroservice, Domaine de Saint Hilaire, 595 rue Pierre Berthier - CS 30531, 13593 Aix en Provence Cedex 03, France

5 F. Hoffmann-La Roche Ltd, CNS Discovery Research, CH-4070 Basel, Switzerland

6 Inserm UMR 837-1, Alzheimer and Tauopathies, Université Lille Nord de France, Centre Jean Pierre Aubert, 1 place Verdun, 59045 Lille, France

7 Inserm U894, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, 91 boulevard de l'Hôpital, 75634 Paris Cedex 13, France

8 Department of Molecular Genetics and Microbiology, University of Florida, College of Medicine, Gainesville, FL 32610, USA

9 Center for NeuroGenetics, University of Florida, College of Medicine, Gainesville, FL 32610, USA

10 Department of Neurology, Chang Gung Memorial Hospital, Keelung 204, Taiwan

11 Department of Neurology, National Hospital Organization, Asahikawa Medical Centre, Asahikawa, Hokkaido, 070-8644, Japan

12 Department of Neurology, Okayama University, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan

13 Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, C.P. 07360 México D.F., México

14 Inserm U955, Université Paris Est, 8 rue du Général Sarrail, 94000 Créteil, France

\*Present address: Departamento de Genética, Instituto Nacional de Rehabilitación, Calzada México Xochimilco 289, C.P. 14389, Mexico D.F., Mexico

Correspondence to: Mario Gomes-Pereira, PhD,

Inserm U781,

Université Paris Descartes

Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine,

Hôpital Necker-Enfants Malades,

75015 Paris,

France

E-mail: mario.pereira@inserm.fr

**Myotonic dystrophy type 1 is a complex multisystemic inherited disorder, which displays multiple debilitating neurological manifestations. Despite recent progress in the understanding of the molecular pathogenesis of myotonic dystrophy type 1 in skeletal muscle and heart, the pathways affected in the central nervous system are largely unknown. To address this question, we studied the only transgenic mouse line expressing CTG trinucleotide repeats in the central nervous system. These mice recreate molecular features of RNA toxicity, such as RNA foci accumulation and missplicing. They exhibit relevant behavioural and cognitive phenotypes, deficits in short-term synaptic plasticity, as well as changes in neurochemical levels. In the search for**

disease intermediates affected by disease mutation, a global proteomics approach revealed RAB3A upregulation and synapsin I hyperphosphorylation in the central nervous system of transgenic mice, transfected cells and post-mortem brains of patients with myotonic dystrophy type 1. These protein defects were associated with electrophysiological and behavioural deficits in mice and altered spontaneous neurosecretion in cell culture. Taking advantage of a relevant transgenic mouse of a complex human disease, we found a novel connection between physiological phenotypes and synaptic protein dysregulation, indicative of synaptic dysfunction in myotonic dystrophy type 1 brain pathology.

**Keywords:** myotonic dystrophy; transgenic mice; synaptic transmission; RAB3A; synapsin I

**Abbreviations:** CA = cornu ammonis; CELF = CUGBP/Elav-like factor; CUGBP = CUG RNA binding protein; CYPHER = Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein; DM = myotonic dystrophy; DMSXL = DM300 mice carrying a >1000 CTG expansion; FITC = fluorescein isothiocyanate; FXR = fragile X mental retardation; GFAP = glial fibrillary acidic protein; GRIN = glutamate receptor ionotropic, N-methyl D-aspartate; LDB = LIM domain binding; MBNL = muscleblind-like; NMDAR = N-methyl D-aspartate receptor; PC = pheochromocytoma; PKC = protein kinase C; RAB = RAS oncogene family; SERCA = sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase; SSC = saline-sodium citrate; UTR = untranslated region.

## Introduction

Myotonic dystrophy is the most common form of adult muscular dystrophy (Harper, 2001). Myotonic dystrophy type 1 is caused by the expansion of a CTG trinucleotide repeat in the 3'-UTR of the dystrophia myotonica-protein kinase (*DMPK*) gene (Brook *et al.*, 1992; Fu *et al.*, 1992; Mahadevan *et al.*, 1992). CTG trinucleotide repeat number correlates directly with disease severity and inversely with age of onset. The myotonic dystrophy type 1 repeat shows a marked tendency towards further expansion in intergenerational transmissions and somatic tissues (Gomes-Pereira and Monckton, 2006). The prevailing model of disease pathogenesis points to a *trans*-dominant effect of expanded *DMPK* transcripts, which accumulate in nuclear foci, interfering with at least two families of alternative splicing regulators: the muscleblind-like (MBNL) and CUGBP/Elav-like (CELF) proteins. MBNL1 loss of function, through sequestration into ribonuclear foci (Miller *et al.*, 2000), and CELF1 upregulation (Timchenko *et al.*, 2001) disturb a developmentally regulated splicing programme, resulting in aberrant expression of embryonic isoforms in adult skeletal muscle and heart (Ranum and Cooper, 2006). Missplicing explains important myotonic dystrophy type 1 symptoms, such as myotonia (Charlet *et al.*, 2002; Mankodi *et al.*, 2002; Lueck *et al.*, 2007) and insulin resistance (Savkur *et al.*, 2001).

Although traditionally considered a muscle disease, myotonic dystrophy type 1 presents many debilitating neurological manifestations. Patients with adult-onset myotonic dystrophy type 1 show prevalent hypersomnia and fatigue, as well as visuocognitive impairment, attention deficits, reduced initiative and apathy (Harper, 2001; Meola and Sansone, 2007), suggesting executive dysfunction and the involvement of the frontal lobes (Meola *et al.*, 2003; Gaul *et al.*, 2006; Meola and Sansone, 2007; Sistiaga *et al.*, 2010). Reduced IQs were measured in one-third of adult and in the majority of childhood-onset patients (Angeard *et al.*, 2007; Meola and Sansone, 2007), whereas moderate to severe mental retardation is a feature of congenital myotonic dystrophy type 1 (Harper, 2001). Additional signs of personality disorder, such as increased anxiety, depression and anhedonia, were reported in a

proportion of patients with myotonic dystrophy type 1 (Bungener *et al.*, 1998; Delaporte, 1998; Meola *et al.*, 2003; Winblad *et al.*, 2005). Region-specific structural abnormalities (including white and grey matter affection) and metabolic changes, revealed by imaging studies, may contribute to myotonic dystrophy type 1 neuropsychological manifestations (Romeo *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2010; Minnerop *et al.*, 2011).

RNA foci accumulate in post-mortem myotonic dystrophy type 1 brain and co-localize with MBNL1 and MBNL2 (Jiang *et al.*, 2004). Nevertheless, the mechanistic links between the genetic mutation and neuropsychological abnormalities remain elusive (Meola and Sansone, 2007). We previously generated transgenic mice expressing *DMPK* transcripts in multiple tissues under the control of the human *DMPK* gene promoter, within the environment of the human myotonic dystrophy type 1 locus. In contrast with control DM20 lines (mice overexpressing short 20 CTG tracts), homozygous mice from two independent DM300 expansion lines (carrying 500–600 CTG), expressing sufficient toxic *DMPK* transcripts, showed wide RNA foci accumulation in a variety of tissues and developed a multisystemic phenotype (Seznec *et al.*, 2001; Guiraud-Dogan *et al.*, 2007; Panaite *et al.*, 2008). Dramatic intergenerational instability in DM300 mice generated DMSXL animals carrying >1000 CTG, who develop a more severe phenotype (Gomes-Pereira *et al.*, 2007; Hugué *et al.*, 2012). We now used DMSXL mice to characterize RNA toxicity in the brain and to identify disease intermediates and pathways affected by myotonic dystrophy type 1 in the CNS. We gathered electrophysiological, neurochemical and molecular evidence of synaptic protein dysregulation and synaptic dysfunction, which translates into myotonic dystrophy type 1-associated behaviour deficits and, most certainly, mediates neurological symptoms.

## Materials and methods

### Transgenic mice

The myotonic dystrophy transgenic mice used in this study carried 45 kb of human genomic DNA cloned from a patient with myotonic dystrophy type 1 as described previously (Seznec *et al.*, 2000;



Gomes-Pereira *et al.*, 2007). Transgenic mice were raised and kept at Centre d'Exploration et de Recherche Fonctionnelle Expérimentale (CERFE, Genopole, Evry, France). Animal housing, care and handling were carried out according to the French and European legislations and the ethical guidelines of the host institution. Genotyping procedures are described in the Supplementary material. The generation, characterization and genotyping of *Mbnl1* and *Mbnl2* knockout mice are described elsewhere (Kanadia *et al.*, 2003; Charizanis *et al.*, 2012).

## Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction quantification of *DMPK* and *Rab3A* transcripts

Total RNA extraction and complementary DNA synthesis were performed as previously described (Gomes-Pereira *et al.*, 2007). *DMPK*, *Dmpk* and *Rab3A* transcripts were amplified in a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) using SYBR<sup>®</sup> Green detection and oligonucleotide primer sequences described in Supplementary Table 1. *DMPK* and *Rab3A* messenger RNA levels were expressed relative to 18S transcripts. The quantification of *DMPK* transcript levels was performed on a complementary DNA sample synthesized from equal RNA quantities extracted from three individual DMSXL homozygous mice. *Rab3A* transcript levels were quantified in six individual DMSXL homozygotes and wild-type control mice. Two independent replicate experiments were performed.

## Fluorescent *in situ* hybridization

Ribonuclear inclusions were detected with a 5'-FITC-labelled 2'-O-methyl-(CAG)<sub>10</sub> oligonucleotide probe or a 5'-Cy3-labelled (CAG)<sub>5</sub> peptide nucleic acid probe, as previously described (Seznec *et al.*, 2001). RNA foci quantification was performed using Discovery Automaton (Roche) (Bassez *et al.*, 2008). Mouse brain regions of interest were anatomically identified, and the percentage of cells containing nuclear foci was calculated based on the observation of >100 cells in each brain region, in each mouse.

## Immunofluorescence combined with fluorescent *in situ* hybridization

After the SSC post-hybridization wash of the fluorescent *in situ* hybridization procedure, sections were incubated in primary antibodies overnight at 4°C (antibody references and working dilutions are listed in Supplementary Table 2), washed five times with PBS for 2 min and then incubated in secondary antibody and 0.001% (m/v) diamidino-2-phenylindole for 15 min at room temperature. Sections were washed five times in PBS before mounting.

## Reverse transcription polymerase chain reaction analysis of alternative splicing

Total RNA extraction, complementary DNA synthesis and semi-quantitative reverse transcriptase PCR analysis were performed as previously described (Gomes-Pereira *et al.*, 2007), using oligonucleotide primers described in Supplementary Table 1. The inclusion ratio of alternative exons in each individual animal was determined in two replicate PCR amplifications to minimize experimental variation.

The percentage of exon inclusion was calculated as [exon inclusion band/(exon inclusion band + exon exclusion band)] × 100.

## Behavioural analysis

Because DMSXL mice display muscle deficits (Huguet *et al.*, 2012), behavioural tests were carefully selected, designed and interpreted to minimize the confounding effects of muscular impairment on brain functional deficits. All the experiments were performed according to the guidelines of the French Ministry of Agriculture for laboratory animal experimentation (law 87-848; Agreement N: A-45-234-8), and the mouse genotype was unknown to the researcher. Mouse behavioural testing was conducted to reduce animal stress to the minimum. Three groups of animals were studied, to limit the number of tests performed on each animal. Group A: open-field, Y maze, passive avoidance and sucrose intake; Group B: marble-burying and Morris water maze; and Group C: saccharine intake. Further details on behavioural phenotyping are described in the Supplementary material.

## Electrophysiological profiling

Input/output properties, paired-pulse facilitation long-term depression and long-term potentiation were assessed on male DMSXL homozygotes and wild-type control mice, aged 7 months (input/output, paired-pulse facilitation and long-term depression) or 4 months (long-term potentiation). Mice were sacrificed by fast decapitation, without previous anaesthesia. Brains were processed in oxygenated buffer and artificial CSF as previously described (Steidl *et al.*, 2006). Extracellular field excitatory post-synaptic potentials were measured with Multi-Electrode Arrays technology (100-µm distant electrodes) on 350-µm-thick hippocampal slices. One of the electrodes stimulated Schaeffer collaterals at the CA3/CA1 interface. The stimulus, consisting of a monopolar biphasic current pulse (negative for 60 µs and then positive for 60 µs), evoked responses (field excitatory post-synaptic potentials) in the CA1 region. Input/output properties: input/output curves were plotted by measuring the response evoked by stimulation intensities varying between 100 and 800 µA. Details on the electrophysiological procedures are included in the Supplementary material.

## Two-dimensional protein electrophoresis and mass spectrometry

Ten-month-old female mice were used to compare the global proteomic profile in frontal cortex and brainstem between six homozygotes carrying expanded repeats (~500–600 CTG) and six females carrying short 20-CTG control tracts. Isoelectric focusing and mass spectrometry were performed as previously described (Sergeant *et al.*, 2003). CELF1 and CELF2 phosphorylation was assessed by 2D gel electrophoresis and immunodetection, using the antibodies shown in Supplementary Table 2.

## Western blot analysis

Primary antibody references and working dilutions are shown in Supplementary Table 2.

## Neurosecretion assays

Neurosecretion assays in cell culture were performed as described previously (Lee *et al.*, 2007).



## Human tissue samples

Autopsy materials were obtained from nine patients with myotonic dystrophy type 1 (Patients G–O; mean age: 60.9 years, range: 32–73 years) and six non-myotonic dystrophy type 1 control subjects (Patients A–F; three with no neurological disease, one with Charcot–Marie–Tooth disease, one with a brain tumour and one with limb-girdle muscular dystrophy; mean age: 68.2 years, range: 53–79 years). Six patients with myotonic dystrophy type 1 (Patients I, J, M, N and O) had signs of classical adult-onset myotonic dystrophy type 1, and they all died of complications related to the disease (respiratory failure or heart disease). Patient G developed late-onset myotonic dystrophy type 1. Patient H carried a large CTG repeat expansion in blood and brain tissue; her clinical form of myotonic dystrophy type 1 was not fully described by the clinicians, but she presented gait problems and general brain atrophy evidenced by neuroimaging. The clinical form of Patient L was not fully described; she carried large CTG repeats, presented gait problems and mild cognitive impairment, and her imaging assessment revealed general brain atrophy. Patient K exhibited mental retardation and was diagnosed with congenital myotonic dystrophy type 1. He died at the age of 32 years from pneumonia. Neuropsychological profiling and neuroimaging were not systematically conducted on the majority of these patients. Further patient details are given in Supplementary Table 3. All experiments using human samples were approved by the Ethics Committee of Asahikawa Medical Centre and Okayama University. Written informed consent specimen use for research was obtained from all patients.

## Statistical analysis

Statistical analyses were performed with JMP 5, Prism 5 and Excel software. When two groups were compared, a two-tailed Student's *t*-test for statistical significance was performed, unless otherwise stated. The significance level was set at  $P < 0.05$  for all statistical analyses. All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), unless otherwise stated.

## Results

### Expression of myotonic dystrophy type 1 CTG expansions results in RNA foci accumulation and missplicing in the central nervous system of DMSXL mice

The toxic RNA hypothesis proposes that accumulation of CUG-containing transcripts is the initiating pathogenic event in myotonic dystrophy type 1. To assess to what extent DMSXL mice recreate central molecular aspects of myotonic dystrophy type 1, we measured *DMPK* transgene expression in CNS regions dissected from 1-month-old DMSXL homozygous mice and found expanded transcripts in all CNS regions investigated, with some regional differences (Supplementary Fig. 1A); *DMPK* transcript levels were higher in the hippocampus, thalamus/hypothalamus, cerebellum and brainstem than in frontal and temporal cortex and in striatum. Overall, the expression levels of the *DMPK* transgene in frontal cortex and cerebellum were approximately three times higher than those of the endogenous *Dmpk* gene (Huguet *et al.*, 2012). Expanded *DMPK* transcripts accumulated in 1 to  $\sim$ 20 ribonuclear inclusions per cell

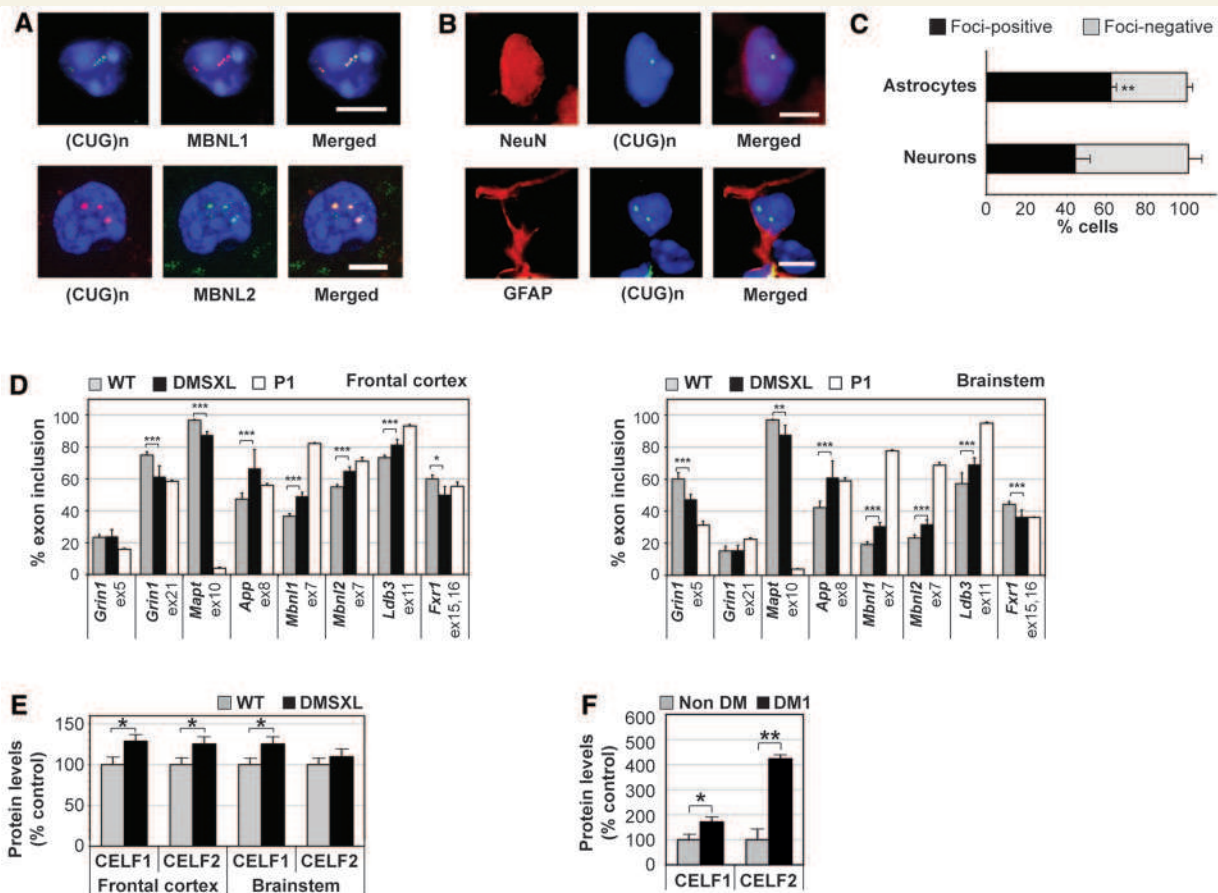
nucleus in both neurons and astrocytes (Fig. 1A) and co-localized with MBNL1 and MBNL2 (Fig. 1B). Astrocytes showed a significantly higher frequency of foci than neurons overall (62 versus 44% foci-containing nuclei) (Fig. 1C). Interestingly, foci distribution was not homogeneous throughout DMSXL brains: they were present in 20% nuclei of striatum, up to 70% in brain cortex and  $\sim$ 80% in the dorsal raphe and raphe magnus nuclei of brainstem (Supplementary Fig. 1B). In addition to the accumulation of RNA foci in neurons previously reported in myotonic dystrophy type 1 human brains (Jiang *et al.*, 2004), we found nuclear foci in human astrocytes (Supplementary Fig. 1C).

To investigate the *trans*-dominant effect of *DMPK* transcripts in the CNS, we studied the alternative splicing of candidate genes. We focused primarily on foci-rich brain regions relevant to disease manifestations. Whereas frontal cortex is involved in executive tasks (Robbins and Arnsten, 2009), brainstem is involved in the control of sleep cycles, respiratory and cardiac function (Izac and Eeg, 2006). Mild region-specific missplicing events were detected in frontal cortex and brainstem of 1-month-old DMSXL homozygotes (Fig. 1D and Supplementary Fig. 2A).

The missplicing of *Mbnl1* exon 7 and *Ldb3* exon 11, two alternative exons specifically regulated by MBNL1 activity (Kalsotra *et al.*, 2008), confirmed the impact of the sequestration of MBNL proteins (Fig. 1B) on alternative splicing deregulation. Similarly, mild missplicing of CELF1-dependent exons 15 and 16 of *Fxr1* predicted a role of CELF1 in CNS spliceopathy. To confirm this hypothesis, we quantified the steady-state levels of CELF proteins and found significant CELF1 and CELF2 upregulation (of  $\sim$ 30%) in DMSXL frontal cortex (Fig. 1E and Supplementary Fig. 1D). In DMSXL brainstem, only CELF1 was significantly upregulated. CELF1 upregulation was associated with mild protein hyperphosphorylation in DMSXL frontal cortex and brainstem (Supplementary Fig. 1E). CELF2 phosphorylation levels did not differ between genotypes in frontal cortex and seemed to decrease in DMSXL brainstem. The upregulation of CELF proteins was more pronounced in human myotonic dystrophy type 1 frontal cortex: CELF1 levels were 70% higher and CELF2 showed a 4-fold increase relative to non-myotonic dystrophy individuals (Fig. 1F and Supplementary Fig. 1F).

Interestingly, wild-type splicing profiles were region-specific (e.g. *Grin1/Nmdar1*; Fig. 1D and Supplementary Fig. 2A). Regional differences were associated with varying steady-state levels of MBNL and CELF proteins between frontal cortex and brainstem in adult mice (Supplementary Fig. 1G), suggesting a determining role of the ratio between antagonistic splicing regulators in the establishment of adult splicing profiles.

We studied the alternative splicing of alternative genes throughout wild-type mouse brain development (Supplementary Fig. 2B), and found that the DMSXL spliceopathy in the CNS modified certain transcripts towards embryonic/newborn splicing profiles. For instance, the splicing patterns of *Grin1* exon 21 and *Mbnl2* exon 7 in DMSXL frontal cortex, as well as *App* exon 8 and *Fxr1* exons 15/16 in DMSXL brainstem, resembled, to a limited extent, the splicing patterns of newborn wild-type mice. The effect was less pronounced in other alternative exons that displayed intermediate inclusion ratios in DMSXL mice of between those characteristic of the embryonic and adult developmental stages (e.g.



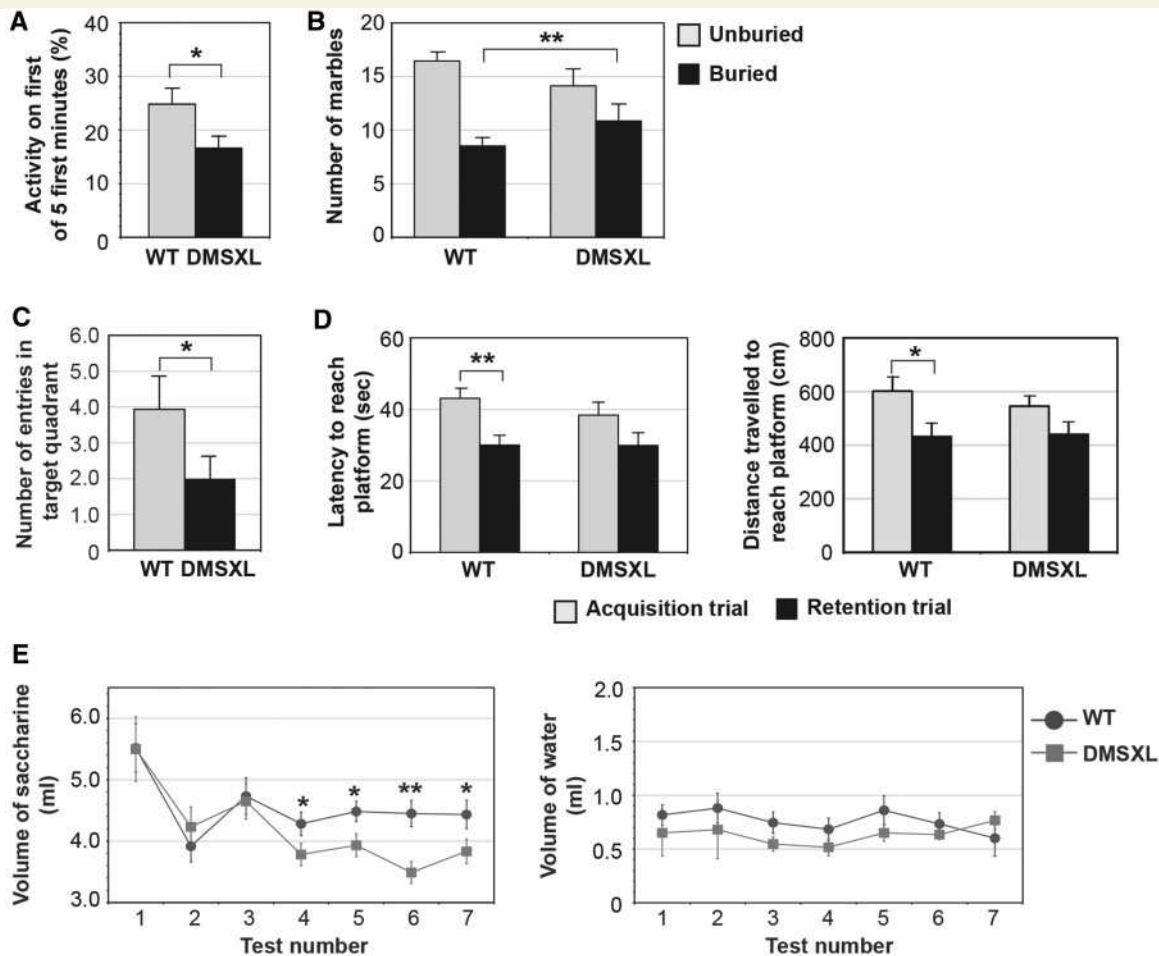
**Figure 1** Expression of an expanded *DMPK* transgene induces foci accumulation and splicing dysregulation in the CNS. (A) Fluorescent *in situ* hybridization and immunofluorescence revealed nuclear foci of transgenic *DMPK* messenger RNA in both NeuN-positive neurons and GFAP-positive astrocytes, in multiple regions of the brain of 1-month-old DMSXL homozygotes. (B) MBNL1 and MBNL2 co-localized with nuclear RNA foci. No RNA foci were observed in DM20 and wild-type control animals (data not shown). Punctuated MBNL2 staining was occasionally detected and did not correspond to RNA aggregates. Diamidino-2-phenylindole was used for nuclear staining. Scale bar = 5  $\mu$ m. (C) Quantification of the percentage of astrocytes and neurons exhibiting nuclear RNA aggregates ( $\pm$ SEM) throughout the brain of 1-month-old DMSXL homozygotes ( $n = 2$ ) (\*\* $P < 0.01$ ,  $\chi^2$  test). (D) Percentage of inclusion of alternative exons in messenger RNA transcripts encoding: GRIN1/NMDAR1 glutamate receptor, ATP2A1/SERCA1 endoplasmic calcium ATPase, microtubule-associated protein tau (MAPT/TAU), amyloid beta precursor protein (APP), insulin receptor (INSR), MBNL1 and MBNL2 splicing regulators, LDB3/CYPHER cytoskeleton-interacting protein and FXR1 RNA-binding protein. The analysis was performed in frontal cortex and brainstem of homozygous DMSXL mice ( $n = 9$ ) and wild-type control mice ( $n = 9$ ) at age 1 month. Splicing profiles were compared with those of wild-type newborns collected as post-natal Day 1 ( $n = 3$ ). The graphs show the average fractional inclusion of the specified exon in triplicate assays ( $\pm$ SEM). (E) Quantification of CELF proteins in homozygous DMSXL ( $n = 3$ ) and wild-type mice ( $n = 3$ ) at age 1 month. (F) Quantification of CELF proteins in frontal cortex of adult myotonic dystrophy type 1 individuals ( $n = 9$ ) and non-myotonic dystrophy control subjects ( $n = 3$ ). The graphs in E and F show the average steady-state levels relative to normalized control subjects. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . WT = wild-type.

*Ldb3* exon 11 in frontal cortex and brainstem; *Grin1* exon 5 in brainstem).

## CTG repeat expansions induce mouse behavioural abnormalities

Following the validation of toxic RNA expression, foci accumulation and missplicing in DMSXL brains, we then investigated the impact of expanded *DMPK* transcripts on mouse behaviour and cognition through blinded phenotyping of adult DMSXL homozygotes. We first assessed mouse activity in the open-field test.

DMSXL mice displayed overall levels of horizontal ( $P = 0.402$ , Student's *t*-test) and vertical activity ( $P = 0.355$ , Student's *t*-test) similar with those of wild-type control mice, excluding a major effect of muscular deficits on mouse performance in this test (Supplementary Fig. 3A). However, DMSXL mice showed a significant decrease in exploratory activity, shortly after transfer into the open-field arena. Although the total number of rearings did not differ between the two genotypes, the percentage of rearings over the first minute out of the first 5 min spent in the arena was significantly lower in DMSXL mice (Fig. 2A). This result reveals freezing behaviour in response to a new and unfamiliar



**Figure 2** DMSXL exhibit novelty-induced inhibition, anxiety, spatial and working memory impairment and anhedonia. (A) Assessment of novelty-induced inhibition in DMSXL homozygotes ( $n = 16$ ) and age-matched control mice ( $n = 16$ ). The graph represents the percentage of the number of rearings ( $\pm$ SEM) in the first minute out of the first 5 min spent in the first open-field session. (B) Assessment of mouse anxiety levels by the marble-burying test. The graph represents the average number of marbles ( $\pm$ SEM) unburied and buried by DMSXL ( $n = 15$ ) and wild-type mice ( $n = 15$ ). The DMSXL line shows a significant shift towards a higher number of buried marbles ( $P = 0.0087$ , Fisher's exact test). (C) Spatial memory assessment by the Morris water maze test. The graph represents the number of entries in the target quadrant ( $\pm$ SEM) during the probe trial, for DMSXL ( $n = 15$ ) and wild-type ( $n = 15$ ) mice. (D) Working memory assessment by the Morris water maze test. The graphs represent the average time and distance travelled ( $\pm$ SEM) to reach the platform in acquisition and retention trials for both genotypes ( $n = 15$  per genotype). (E) Saccharine consumption test for anhedonia. The graph on the left represents the average volume of saccharine solution ( $\pm$ SEM) drank by DMSXL homozygotes ( $n = 12$ ) and wild-type control mice ( $n = 12$ ). The volume of water consumed once saccharine became available did not differ between the two genotypes (graph on the right). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ . WT = wild-type.

environment and indicates novelty-induced inhibition, suggestive of increased anxiety. This was confirmed by the assessment of obsessive-compulsive behaviour using a marble-burying test. DMSXL mice displayed a statistically significant shift towards a higher number of fully buried marbles (Fig. 2B), indicative of increased anxiety.

We then examined whether the expression of expanded *DMPK* transcripts resulted in memory impairment as observed in patients with myotonic dystrophy type 1. Mouse spatial memory was assessed by the Morris water maze. The platform was located in the same target quadrant during the training period, and it was removed during the probe trial. DMSXL mice showed impaired spatial memory, illustrated by a significantly lower number of

entries in the target quadrant during the probe trial (Fig. 2C). DMSXL swimming speed was not significantly different between genotypes (Supplementary Fig. 3B), excluding biases introduced by impaired motor performance. In the assessment of working memory, a component of the executive function (Robbins and Arnsten, 2009), both genotypes were capable of finding the platform in the acquisition trial. The apparent lower latency ( $P = 0.3066$ , Student's *t*-test) and shorter distance ( $P = 0.4490$ , Student's *t*-test) travelled by DMSXL mice were not statistically different from those of wild-type control mice. Both genotypes showed similar performances in the acquisition trial. As expected, wild-type mice performed significantly better in the retention than in acquisition trial (latency:  $P = 0.0019$ ; distance travelled:



$P = 0.0148$ ; Student's  $t$ -test), indicating that working memory was present. In contrast, DMSXL mouse performance did not improve significantly between the two trials (latency:  $P = 0.1916$ ; distance travelled:  $P = 0.2726$ ; Student's  $t$ -test), suggesting possible mild working memory impairment (Fig. 2D). Non-spatial long-term memory, assessed by the passive avoidance conditioning test, was not affected in DMSXL mice (Supplementary Fig. 3C).

Anhedonia, previously reported in patients with myotonic dystrophy type 1, was assessed by the consumption of a highly palatable solution of saccharine (Schweizer *et al.*, 2009). The similar volume of water drunk during the habituation period by DMSXL and wild-type mice (Day 1:  $P = 0.136$ ; Day 2:  $P = 0.538$ ; Student's  $t$ -test) shows similar satiety between the two genotypes (Supplementary Fig. 3D). Once saccharine became available, both animal groups showed a pronounced initial interest in the saccharine solution, showing again similar satiety over the first 3 days of testing (Test 1:  $P = 0.980$ ; Test 2:  $P = 0.450$ ; Test 3:  $P = 0.843$ ; Student's  $t$ -test). However, as the test progressed, DMSXL interest in the saccharine solution was significantly lower, as compared with wild-type control mice (Test 4:  $P = 0.043$ ; Test 5:  $P = 0.037$ ; Test 6:  $P = 0.003$ ; Test 7:  $P = 0.043$ ; Student's  $t$ -test), suggesting an anhedonic-like behaviour (Fig. 2E).

## DMSXL mice exhibit deficits in short-term synaptic plasticity

In parallel with the behavioural and cognitive phenotyping of DMSXL mice, we have assessed the physiological impact of toxic *DMPK* transcripts on synaptic function. To this end, we performed the electrophysiological profiling of DMSXL hippocampus, a brain region showing foci accumulation and missplicing (Supplementary Fig. 4). We first examined basal synaptic transmission by stimulating hippocampal Schaffer collaterals at increasing intensities and generating input/output curves from measures of field excitatory post-synaptic potentials. DMSXL homozygotes exhibited slightly higher field excitatory post-synaptic potentials relative to wild-type control mice, but the overall input/output curves were similar between both genotypes (Fig. 3A), indicating no major deficits in basal transmission. We next investigated some short-term plasticity properties through the quantification of paired-pulse facilitation. DMSXL slices displayed significantly reduced paired-pulse facilitation ratios, indicative of presynaptic dysfunction (Fig. 3B). Finally, we measured long-term depression and potentiation, which support some forms of learning and memory. Standard long-term depression and long-term potentiation protocols did not reveal overt abnormalities in DMSXL mice (Fig. 3C and D). However, early after low-frequency stimulation, long-term depression amplitude was slightly lower in DMSXL than in wild-type slices ( $36 \pm 7\%$  versus  $47 \pm 3\%$ ), which might suggest mild impairment of the post-synaptic response. The difference between genotypes, however, did not reach statistical significance ( $P = 0.142$ , repeated measures two-way ANOVA). Depression stabilized after 20 min, being similar for both genotypes at the endpoint of the experiment. In summary, the number of animals studied did not show marked abnormalities in long-term plasticity, but revealed significant deficits in short-term synaptic plasticity.

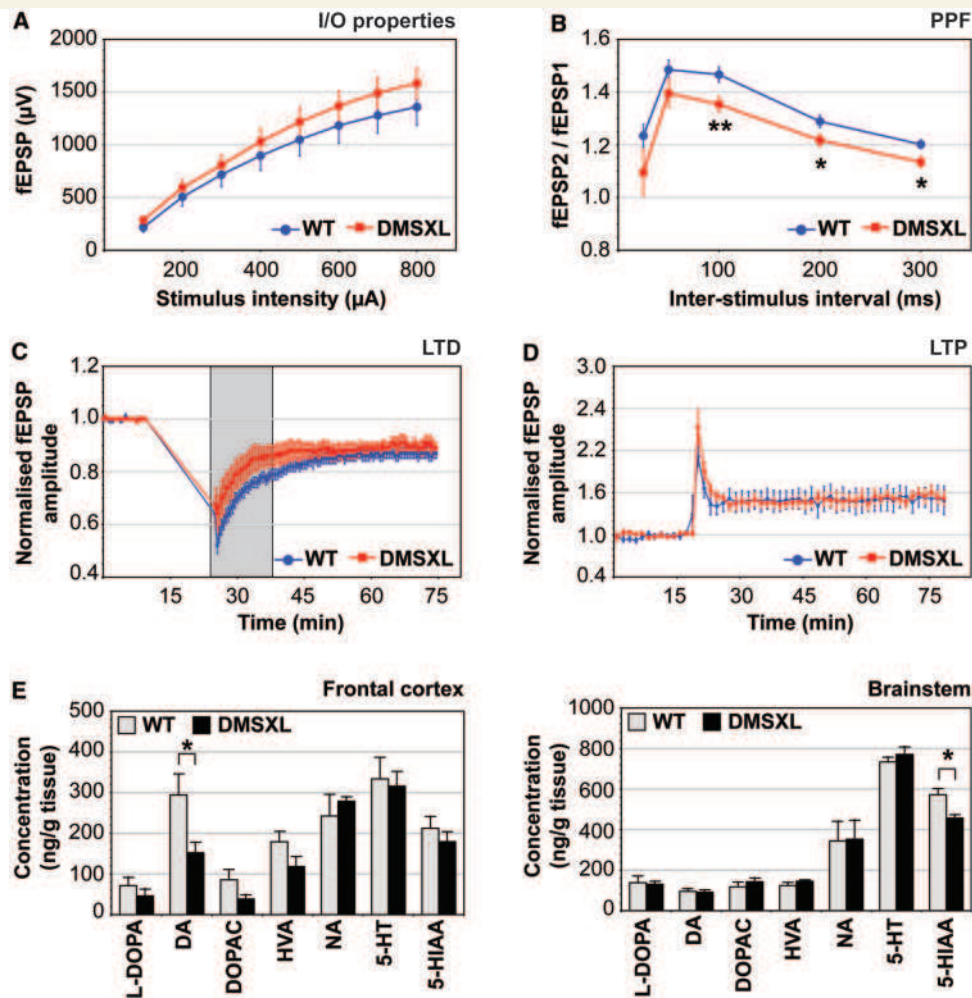
## DMSXL brains show abnormal levels of dopamine and serotonin metabolites

Neurotransmitter dysregulation can cause behavioural and electrophysiological dysfunction. Little is known about neurochemical signalling and metabolism in myotonic dystrophy type 1 brains. To further dissect the neurological phenotype of DMSXL mice and assess whether behavioural and electrophysiological phenotypes were associated with changes in neurotransmitter levels, we measured key neurosignalling molecules in DMSXL brains. Adult DMSXL mice revealed a significant reduction of dopamine in the frontal cortex, as well as a tendency to decreased levels of its precursor (L-DOPA) and metabolites (3,4-dihydroxyphenylalanine, homovanillic acid). A significant decrease of 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA, the main serotonin metabolite) was detected in the brainstem of DMSXL mice (Fig. 3E).

## Synaptic protein abnormalities in DMSXL mice and patients with myotonic dystrophy type 1

To identify pathways affected in the CNS that might contribute to the behavioural and electrophysiological phenotypes, we compared the proteomic profiles of adult homozygous mice carrying CTG expansions with those of DM20 control mice overexpressing short *DMPK* transcripts. The use of DM20 control mice excluded the identification of disease intermediates possibly affected by overexpression of *DMPK* protein. The proteomics analysis suggested altered expression of RAB3A and post-translational modifications of synapsin I (SYN1). Western blot quantification confirmed a statistically significant upregulation of RAB3A and hyperphosphorylation of serine residues of SYN1 in DMSXL frontal cortex and hippocampus at age 4 months (Fig. 4A and Supplementary Fig. 5A and B). To further test if synaptic protein dysregulation could be mediated by overexpression of short *DMPK* transcripts and protein, we analysed DM20 mice carrying 20 CTG repeats by western blot. This *DMPK* overexpressing control line did not show RAB3A upregulation or SYN1 hyperphosphorylation (Fig. 4B), indicating that the defects observed are mediated by the expression of expanded CUG RNA repeats. We extended the analysis to other synaptic proteins to assess the extent of synaptic dysfunction, but found no additional abnormalities (Supplementary Fig. 5C and D). Our data suggest that, rather than interfering with synaptic proteins in general, the repeat expansion may affect (directly or indirectly) a limited number of synaptic targets.

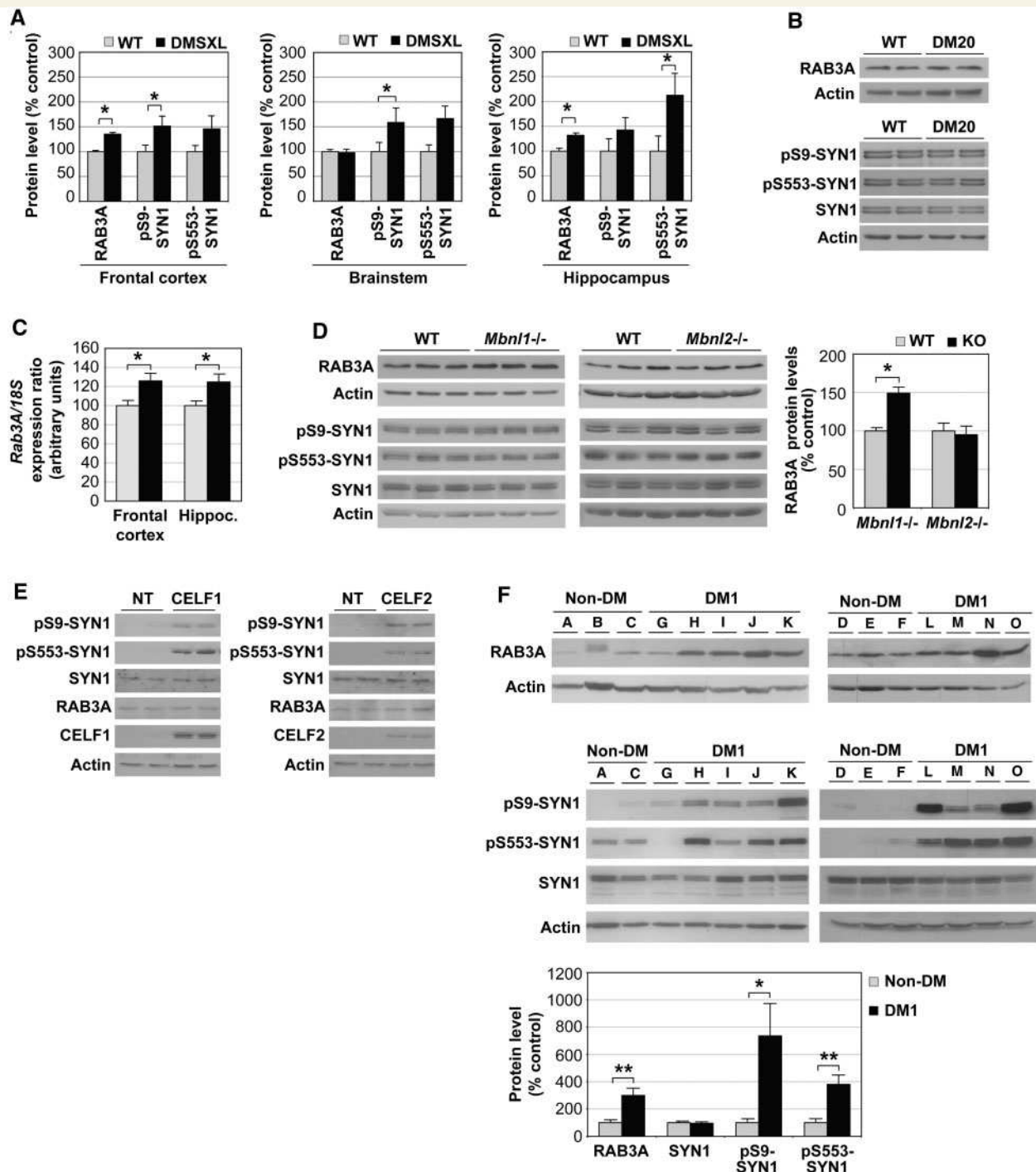
To address the mechanisms of synaptic protein dysregulation, we first tested if these abnormalities were associated with missplicing of known alternative exons of *Rab3A* and *Syn1* transcripts. Reverse transcriptase PCR analysis revealed that *Rab3A* and *Syn1* alternative splicing was not affected in DMSXL mice at age 4 months (Supplementary Fig. 5E), an age when synaptic protein abnormalities are detected. RAB3A and SYN1 protein changes are not mediated by spliceopathy of the candidate alternative exons studied. Interestingly, RAB3A upregulation was associated with a significant increase of messenger RNA transcript levels in DMSXL frontal cortex and hippocampus (Fig. 4C).



**Figure 3** DMSXL mice exhibit deficits in short-term synaptic plasticity and changes in neurochemical levels. (A) Electrophysiological profiling of DMSXL mice and age-matched control mice. Input/output (I/O) characteristics in the CA1 region. Mean value of field excitatory post-synaptic potentials (fEPSP) ( $\pm$ SEM) is expressed as a function of stimulation intensity. (B) Paired-pulse facilitation (PPF) in the CA1 region. The mean ratio of the second peak compared with the first one (fEPSP<sub>2</sub>/fEPSP<sub>1</sub>,  $\pm$ SEM) is expressed as a function of the interstimulus interval. Paired-pulse facilitation values were significantly lower in DMSXL hippocampal slices (repeated measures two-way ANOVA). The difference between genotypes was more pronounced for interstimulus intervals of 100, 200 and 300 ms. (C) Long-term depression (LTD) in the CA1 region. Mean value of normalized field excitatory post-synaptic potentials amplitude ( $\pm$ SEM) is expressed as a function of time. Long-term depression amplitude was slightly lower in DMSXL slices, shortly after low frequency stimulation (grey box), but overall long-term depression amplitude was not significantly different between DMSXL and wild-type mice. (D) Long-term potentiation (LTP) in the CA1 region. Mean value of normalized field excitatory postsynaptic potentials amplitude ( $\pm$ SEM) is expressed as a function of time. Long-term potentiation did not significantly differ between DMSXL and wild-type mice. Input/output, paired-pulse facilitation and long-term depression data correspond to values averaged from 16 independent slices prepared from DMSXL ( $n = 5$ ) and wild-type mice ( $n = 5$ ). Long-term potentiation data correspond to values averaged from 10 independent slices prepared from four DMSXL ( $n = 4$ ) and five independent slices from three wild-type mice ( $n = 3$ ). (E) Quantification of neurochemicals in the brain of DMSXL ( $n = 5$ ) and wild-type control mice ( $n = 5$ ) at age 4 months. Average concentration ( $\pm$ SEM) of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), noradrenaline (NA), serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) are plotted for frontal cortex and brainstem. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

We then tested if *Mbn1* or *Mbn2* inactivation was sufficient to dysregulate synaptic proteins, through the analysis of knockout mice (Kanadia et al., 2003; Charizanis et al., 2012). Western blot analysis revealed that *Mbn1* inactivation (but not *Mbn2*) resulted in a significant increase of RAB3A protein levels in mouse frontal cortex (Fig. 4D). Neither *Mbn1* nor *Mbn2* loss of function affected SYN1 phosphorylation levels. To test whether

SYN1 hyperphosphorylation is mediated by upregulation of CELF proteins, we transfected PC12 cells with expression vectors encoding CELF1 or CELF2. We studied SYN1 phosphorylation by western blot and found protein hyperphosphorylation in PC12 cells overexpressing CELF1 or CELF2 (Fig. 4E). This analysis indicated that upregulation of CELF proteins is sufficient to dysregulate SYN1 phosphorylation levels.



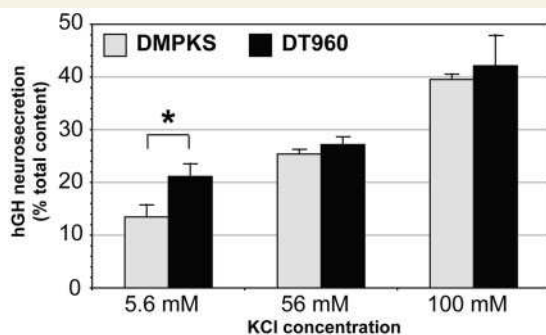
**Figure 4** Abnormal metabolism of RAB3A and SYN1 in the CNS of DMSXL mice and patients with myotonic dystrophy type 1. (A) Average steady-state levels ( $\pm$ SEM) of RAB3A and phosphorylated SYN1 in the frontal cortex, brainstem and hippocampus of homozygous DMSXL mice ( $n = 9$ ), relative to normalized age-matched wild-type (WT) control mice ( $n = 9$ ) at age 4 months. (B) Western blot analysis of RAB3A protein levels and SYN1 phosphorylation in 4-month-old DM20 and wild-type mice ( $n = 2$  per genotype). (C) RAB3A protein upregulation in DMSXL brains is associated with increased transcript levels. Real-time quantitative PCR of *Rab3A* messenger RNA in frontal cortex and hippocampus of DMSXL ( $n = 6$ ) and wild-type mice ( $n = 6$ ). The graph shows the average *Rab3A* relative expression ( $\pm$ SEM) at age 4 months.  $*P < 0.05$ . (D) Western blot analysis of RAB3A protein levels and SYN1 phosphorylation in frontal cortex of knockout (KO) mice inactivated for *Mbn1*<sup>-/-</sup> and *Mbn2*<sup>-/-</sup> deficient mice. The graph on the right represents the average RAB3A steady state-levels ( $\pm$ SEM) in knockout mice ( $n = 3$ ), relative to normalized age-matched wild-type control mice ( $n = 3$ ). (E) Western blot analysis of RAB3A protein levels and SYN1 phosphorylation in PC12 cells overexpressing CELF1 or CELF2. NT = non-transfected cells. (F) RAB3A upregulation and SYN1 hyperphosphorylation in frontal cortex of adult patients with myotonic dystrophy type 1 (DM1;  $n = 9$ ), relative to non-myotonic dystrophy control subjects (non-DM;  $n = 6$ ). One non-myotonic dystrophy control subjects (Patient B) did not show a suitable SYN1 signal (possibly because of protein degradation) and was excluded from the analysis.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ .



To ascertain whether RAB3A and SYN1 dysregulation in mice reflected a pathophysiological event of the human condition, we investigated post-mortem myotonic dystrophy type 1 frontal cortex (Fig. 4F). Western blot quantification confirmed statistically significant RAB3A upregulation in patients with myotonic dystrophy type 1 when compared with subjects with non-myotonic dystrophy type 1 ( $P = 0.0054$ , Student's *t*-test). SYN1 was hyperphosphorylated at Ser9 ( $P = 0.0282$ , Student's *t*-test) and Ser553 ( $P = 0.0032$ , Student's *t*-test) amino acid residues in individuals with myotonic dystrophy type 1. Abnormal phosphorylation was not accompanied by changes in protein steady-state levels ( $P = 0.7658$ , Student's *t*-test). These results show that proteins playing important roles in synaptic function are dysregulated in myotonic dystrophy type 1.

## Expanded CUG-containing *DMPK* transcripts affect neuronal exocytosis in culture

To investigate the functional consequences of myotonic dystrophy type 1 repeat expansions, and in particular, altered expression of synaptic proteins on vesicle trafficking, we studied exocytosis in an established transfected cell culture model of neurosecretion. Regulated exocytosis is triggered by extracellular stimulus and exhibits low-basal spontaneous secretion in the absence of stimulation (Sudhof, 2004). Basal and regulated neurosecretion can be measured in cultured PC12 cells transiently transfected with human growth hormone (Sugita, 2004; Lee *et al.*, 2007). The percentage of human growth hormone secreted before and after osmotic stimulation serves as an estimate of basal and regulated neurosecretion, respectively. To assess the effect of CTG repeats on vesicle trafficking, PC12 cells were co-transfected with a human growth hormone-producing plasmid and with *DMPK* constructs carrying a CTG expansion or no CTG repeats. Expanded



**Figure 5** Toxic CUG repeats dysregulate neurosecretion in culture. Quantification of the effect of CTG repeat expansion on neurosecretion. The average secretion from human growth hormone-expressing PC12 cells co-transfected with expanded DT960 or no-expansion DMPKS plasmids is plotted as a per cent of total human growth hormone content ( $\pm$ SEM). Basal secretion was measured in control medium containing 5.6 mM KCl. Stimulus-dependent secretion was measured in media containing 56 or 100 mM KCl. hCG = human growth hormone.

CUG-containing RNA accumulated in the nucleus of PC12 cells, co-localized with MBNL1 and MBNL2 and induced mild missplicing. More importantly, transfected PC12 cells exhibited RAB3A upregulation and SYN1 hyperphosphorylation (Supplementary Fig. 6). The neurosecretion assay demonstrated that the expression of toxic RNA repeats enhanced basal neurosecretion in the absence of stimulation, relative to no-repeat control constructs (Fig. 5). The effect was observed in four independent experiments with a significant average basal secretion enhancement of  $60 \pm 16\%$ , during 15 min of incubation. Interestingly, CUG-containing transcripts did not disturb regulated neurosecretion after osmotic stimulation.

## Discussion

To explore myotonic dystrophy type 1 neuropathology, we studied myotonic dystrophy type 1 transgenic mice that reproduce key molecular aspects of RNA toxicity and exhibit relevant behavioural phenotypes. DMSXL mice display neurochemical and electrophysiological signs of synaptic dysfunction, which are associated with molecular abnormalities in synaptic proteins, observed not only in mice but also in transfected cells and post-mortem myotonic dystrophy type 1 brain samples. The association between physiological and molecular phenotypes of the synapse indicates synaptic dysfunction in myotonic dystrophy type 1 neuropathophysiology.

The expression of expanded *DMPK* transcripts in the CNS of transgenic mice results in the accumulation of RNA foci in neurons and astrocytes. RNA toxicity in both cell types indicates that myotonic dystrophy type 1 may be associated not only with neuronal dysfunction but also with glial abnormalities. Interestingly, brain areas showing the highest foci content (e.g. frontal cortex) did not necessarily express the highest *DMPK* levels, suggesting that RNA aggregation into foci may depend on region- and/or cell-type-specific factors. As in skeletal (Lin *et al.*, 2006; Orengo *et al.*, 2008) and cardiac (Wang *et al.*, 2007) muscles, CUG toxicity interferes with developmental alternative splicing in the CNS, increasing to a limited extent the abnormal expression of embryonic isoforms of some transcripts in adult DMSXL brains. Splicing abnormalities in the CNS may contribute to DMSXL phenotype. In particular, *Grin1/Nmdar1* and *Mapt/Tau* splicing defects likely participate in synaptic dysfunction detected in DMSXL mice. Further experiments are required to investigate how *Grin1/Nmdar1* missplicing influences intracellular localization and function of this receptor, as well as the impact of *Mapt/Tau* missplicing on myotonic dystrophy type 1 neurofibrillary degeneration.

The missplicing of alternative exons specifically regulated by MBNL or CELF proteins (Kalsotra *et al.*, 2008) indicated that MBNL loss of function by protein sequestration and CELF upregulation induce missplicing in the CNS. In support of this view, *Mbnl1*- or *Mbnl2*-deficient mice show abnormal splicing in brain (Charizanis *et al.*, 2012; Suenaga *et al.*, 2012).

CELF1 upregulation in the CNS appears to be mediated by mild protein hyperphosphorylation, as in myotonic dystrophy type 1 heart (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007). It remains to be investigated whether PKC activity is increased in the myotonic dystrophy

type 1 brains. In contrast, CELF2 upregulation in DMSXL frontal cortex was not associated with protein hyperphosphorylation, suggesting alternative mechanisms of protein regulation. The marked upregulation of CELF2 in human myotonic dystrophy type 1 frontal cortex predicts a pathogenic role for this protein in myotonic dystrophy type 1 neuropathogenesis. The modulation of CELF2 expression by miRNA species, recently reported in a transgenic mouse model of spinal-bulbar muscular atrophy (SBMA), suggests new possibilities for miRNA-mediated therapies in myotonic dystrophy type 1 (Miyazaki *et al.*, 2012).

The behavioural phenotyping of DMSXL mice revealed reduced exploratory activity, increased anxiety, spatial memory impairment and anhedonia, which resemble myotonic dystrophy type 1 neurological manifestations. Previous neuropsychological assessment of patients with myotonic dystrophy type 1 revealed low scores in the exploratory scale (Winblad *et al.*, 2005), a higher prevalence of anxiety-related behaviours (Delaporte, 1998; Meola *et al.*, 2003), visual–spatial impairment (Modoni *et al.*, 2004) and anhedonia associated with emotional blunting and depressive symptomatology (Bungener *et al.*, 1998). The phenotypic parallel between patients and transgenic mice illustrates the impact of toxic *DMPK* transcripts on CNS physiology and corroborates the use of the DMSXL mouse line to recreate myotonic dystrophy type 1 brain pathology. Mild deficits in working memory were also found in DMSXL mice. Although not statistically significant, the initial difference between the two genotypes in the acquisition trial, during the working memory assessment, might confound the analysis, and the results should be interpreted with some caution. Alternative behavioural tests (e.g. elevated or multiple arm radial mazes) might prove useful to provide definitive evidence of working memory deficits in DMSXL mice.

The behavioural abnormalities of DMSXL mice are associated with deficits in short-term plasticity, as well as changes in neurochemicals, suggesting altered synaptic function and neurotransmission in response to the CTG repeat expansion. The neurochemical data, in particular, provide insight into the neuronal circuits affected by myotonic dystrophy type 1. Decreased dopamine in frontal cortex may account for motivation and reward deficits (Arias-Carrion and Poppel, 2007), while the reduced serotonin metabolism in brainstem may increase susceptibility to depressive-like behaviours (Werner and Covenas, 2010), thereby contributing to anhedonia. The high foci content in dopaminergic (substantia nigra) and serotonergic (raphe nucleus) brain centres may contribute, at least partially, to the neurochemical deficits of DMSXL mice. In humans, loss of catecholaminergic neurons (dopamine is an abundant catecholamine) and serotonin-containing neurons were previously reported (Ono *et al.*, 1998a, b). The involvement of dopaminergic and serotonergic pathways in myotonic dystrophy type 1 neuropathology requires further investigation, and may provide insight into future means of therapeutic intervention, such as the modulation of the dopaminergic and serotonergic circuits.

In the search for pathways affected by the myotonic dystrophy type 1 repeat mutation in the CNS, we found RAB3A upregulation and SYN1 hyperphosphorylation, not only in transgenic mice expressing large CTG expansions but also in post-mortem myotonic dystrophy type 1 brains. Transgenic mice overexpressing

short *DMPK* transcripts did not show abnormal synaptic protein dysregulation, indicating that RAB3A and SYN1 misregulation is specifically associated with expanded transcripts.

Decreased glucose metabolism (Fiorelli *et al.*, 1992) and blood perfusion (Meola *et al.*, 1999) have been previously described in the frontal lobe of patients with myotonic dystrophy type 1. Since abnormal glucose metabolism can alter the protein content of synaptic vesicles (Gaspar *et al.*, 2010), it is reasonable to speculate that changes in the exocytotic machinery in frontal cortex might result (at least partially) from brain hypoperfusion and/or hypometabolism. Despite the possible contribution of altered glucose metabolism to synaptic dysfunction, cells transfected with myotonic dystrophy type 1 repeat expansions displayed RAB3A upregulation and SYN1 hyperphosphorylation in culture, supporting the view that synaptic protein dysregulation is also a direct consequence of CUG RNA toxicity, rather than a simple indirect effect, secondary to general brain dysfunction. To further support this hypothesis, the analysis of complementary animal and cell models of myotonic dystrophy type 1 revealed that RAB3A upregulation is mediated by MBNL1 inactivation, and SYN1 hyperphosphorylation is mediated by upregulation of CELF proteins. We propose that transcriptional dysregulation (Osborne *et al.*, 2009) or altered post-transcriptional regulation of messenger RNA decay (Masuda *et al.*, 2012) through loss of function of MBNL proteins could mediate RAB3A upregulation. Hyperphosphorylation of SYN1 may result from dysregulated kinase and/or phosphatase activities, as a result of altered CELF levels. Dysregulation of micro-RNAs, also reported in myotonic dystrophy type 1 skeletal muscle and heart (Gambardella *et al.*, 2010; Perbellini *et al.*, 2011; Rau *et al.*, 2011), may extend to the CNS, opening new avenues for future research.

RAB3A is an abundant synaptic vesicle protein that regulates neurotransmission (Sudhof, 2004). Mouse *Rab3a* inactivation results in increased hippocampal paired-pulse facilitation (Geppert *et al.*, 1997), while RAB3A overexpression in cell culture activates spontaneous exocytosis (Schluter *et al.*, 2002), similar to PC12 cells transfected with expanded *DMPK* constructs. Given the involvement of RAB3A in short-term synaptic plasticity and neurotransmitter release, RAB3A upregulation in DMSXL mice likely contributes to altered paired-pulse facilitation and mediates the increase in basal neurosecretion in transfected PC12 cells. In addition, RAB3A has been implicated in visual–spatial learning (D'Adamo *et al.*, 2004). Therefore, altered RAB3A expression may contribute to the cognitive deficits of DMSXL mice and patients with myotonic dystrophy type 1. Synapsins comprise the most abundant proteins in synaptic vesicles. SYN1 serves as a phosphorylation-dependent regulator of neurotransmitter release (Rosahl *et al.*, 1993). Whereas non-phosphorylated SYN1 attaches synaptic vesicles to the actin cytoskeleton, stimulation-dependent phosphorylation decreases the affinity for synaptic vesicles and potentiates exocytosis (Fdez and Hilfiker, 2006). Consistent with a role for SYN1 in short-term plasticity (Fiumara *et al.*, 2007), chemically induced hyperphosphorylation of SYN1 *in vivo* was previously associated with decreased paired-pulse facilitation (Tallent *et al.*, 2009), like in DMSXL mice. The marked RAB3A upregulation and abnormal SYN1 hyperphosphorylation in post-mortem myotonic dystrophy type 1 brains corroborate their role in myotonic dystrophy type 1 neuropathology.



RAB3A and SYN1 variability between patients may be associated with different degrees of disease severity, as previously reported for splicing abnormalities in skeletal muscle and heart (Wang *et al.*, 2007; Orengo *et al.*, 2008). In summary, we found RAB3A upregulation and SYN1 hyperphosphorylation in myotonic dystrophy type 1 transgenic mice, transfected cells and in human myotonic dystrophy type 1 brain samples. These protein defects were associated with electrophysiological and behavioural abnormalities in mice, as well as altered spontaneous neurosecretion in cell culture.

If changes in synaptic proteins reflect greater abnormalities in the dynamics and microstructure of the brain cell membrane, the molecular abnormalities identified might have wider implications and may correlate with the prevalent white matter lesions reported in myotonic dystrophy type 1 brains (Minnerop *et al.*, 2011). Future MRI of DMSXL brain integrity will address this possibility through the characterization of tissue changes in response to the myotonic dystrophy type 1 mutation. Additional imaging measurements of regional brain blood flow and/or glucose metabolism in transgenic mice by PET and/or single-photon emission computed tomography must be performed to evaluate and localize the functional impact of myotonic dystrophy type 1 in the CNS and provide insight into the underlying mechanisms.

There is currently debate whether CNS dysfunction in myotonic dystrophy type 1 is neurodegenerative, neurodevelopmental or neurofunctional. Although clinical data are not enough to answer this difficult question, transgenic mice may provide significant insight. The molecular and electrophysiological abnormalities detected in DMSXL mice are consistent with functional deficits in adult brain. Future analyses of cell loss and the CNS investigation throughout mouse development will be required to address the contribution of neurodegeneration and impaired neurodevelopment, respectively, towards myotonic dystrophy type 1 CNS dysfunction. It remains possible that these processes are not mutually exclusive, and that they all participate in myotonic dystrophy type 1 brain pathophysiology.

In the context of the preclinical assessment of future therapies, it will be interesting to investigate whether therapeutic schemes targeting the CNS (and in particular RAB3A and SYN1) will be able to reverse the behavioural phenotypes (e.g. visual–spatial memory impairment, increased anxiety and anhedonia) and/or electrophysiological profiles (e.g. paired-pulse facilitation deficits) of DMSXL mice. In cell culture, RAB3A and SYN1 can modulate miniature endplate currents of neurons (Chiappalone *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). It is tempting to investigate whether RAB3A knockdown and/or SYN1 dephosphorylation in primary cultures can rescue the electrophysiological phenotype of DMSXL neurons.

Using molecular and physiological approaches to explore the molecular mechanisms of a complex human disease, we generated evidence of the impact of myotonic dystrophy type 1 on synaptic proteins, vesicle secretion, neurotransmission and synaptic plasticity. The validation of our molecular findings in post-mortem myotonic dystrophy type 1 brains substantiates a role of synaptic dysfunction in myotonic dystrophy type 1 through changes in proteins involved in the regulation of synaptic vesicle release.

## Acknowledgements

The authors thank Dr Shuzo Sugita and Dr Thomas Cooper for providing the pHGCMV5, DMPKs, DT960, CELF1 and CELF2 plasmids and Dr Glenn Morris and Dr Manuel Hernández for providing the anti-MBNL2 and anti- $\beta$ -actin antibodies, respectively. They are grateful to Amine Bouallague and to the personnel of CERFE (Centre d'Exploration et de Recherche Fonctionnelle Expérimentale, Genopole, Evry, France) for attentively caring for the mice. They thank their colleagues at Inserm U781 and the DM1 French Splicing Network for helpful discussions.

## Funding

ANR (Agence Nationale de Recherche, France; "DM1MICE" project to G.G.); AFM (Association Française contre les Myopathies, France; 'DM Brain' project to M.G.-P.); Prosensa (The Netherlands, to M.G.-P.); INSERM (Institut National de la Santé et Recherche Médicale, France); Université Paris Descartes (Paris, France); CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico, to O.H.-H.); Ministère Français de la Recherche et Technologie (to G.S.); NIH (National Institutes of Health, AR046799 and NS058901 to M.S.S.).

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

## References

- Angeard N, Gargiulo M, Jacqueline A, Radvanyi H, Eymard B, Heron D. Cognitive profile in childhood myotonic dystrophy type 1: is there a global impairment? *Neuromuscul Disord* 2007; 17: 451–8.
- Arias-Carrion O, Poppel E. Dopamine, learning, and reward-seeking behavior. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2007; 67: 481–8.
- Bassez G, Chapoy E, Bastuji-Garin S, Radvanyi-Hoffman H, Authier FJ, Pellissier JF, et al. Type 2 myotonic dystrophy can be predicted by the combination of Type 2 muscle fiber central nucleation and scattered atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67: 319–25.
- Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, et al. 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; 69: 799–808.
- Bungener C, Jouvent R, Delaporte C. Psychopathological and emotional deficits in myotonic dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65: 353–6.
- Charizanis K, Lee KY, Batra R, Goodwin M, Zhang C, Yuan Y, et al. Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron* 2012; 75: 437–50.
- Charlet BN, Savkur RS, Singh G, Philips AV, Grice EA, Cooper TA. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* 2002; 10: 45–53.
- Chiappalone M, Casagrande S, Tedesco M, Valtorta F, Baldelli P, Martinoia S, et al. Opposite changes in glutamatergic and GABAergic transmission underlie the diffuse hyperexcitability of synapsin I-deficient cortical networks. *Cereb Cortex* 2009; 19: 1422–39.
- D'Adamo P, Wolfer DP, Kopp C, Tobler I, Toniolo D, Lipp HP. Mice deficient for the synaptic vesicle protein Rab3a show impaired spatial

- reversal learning and increased explorative activity but none of the behavioral changes shown by mice deficient for the Rab3a regulator Gdi1. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 1895–905.
- Delaporte C. Personality patterns in patients with myotonic dystrophy. *Arch Neurol* 1998; 55: 635–40.
- Fdez E, Hilfiker S. Vesicle pools and synapsins: new insights into old enigmas. *Brain Cell Biol* 2006; 35: 107–15.
- Fiorelli M, Duboc D, Mazoyer BM, Blin J, Eymard B, Fardeau M, et al. Decreased cerebral glucose utilization in myotonic dystrophy. *Neurology* 1992; 42: 91–4.
- Fiumara F, Milanese C, Corradi A, Giovedi S, Leitinger G, Menegon A, et al. Phosphorylation of synapsin domain A is required for post-tetanic potentiation. *J Cell Sci* 2007; 120: 3228–37.
- Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG Jr, King J, Rajnarayan S, Dunne PW, et al. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 1992; 255: 1256–8.
- Gambardella S, Rinaldi F, Lepore SM, Viola A, Loro E, Angelini C, et al. Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients. *J Transl Med* 2010; 8: 48.
- Gaspar JM, Baptista FI, Galvao J, Castilho AF, Cunha RA, Ambrosio AF. Diabetes differentially affects the content of exocytotic proteins in hippocampal and retinal nerve terminals. *Neuroscience* 2010; 169: 1589–600.
- Gaul C, Schmidt T, Windisch G, Wieser T, Muller T, Vielhaber S, et al. Subtle cognitive dysfunction in adult onset myotonic dystrophy type 1 (DM1) and Type 2 (DM2). *Neurology* 2006; 67: 350–2.
- Geppert M, Goda Y, Stevens CF, Sudhof TC. The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature* 1997; 387: 810–4.
- Gomes-Pereira M, Foiry L, Nicole A, Huguët A, Junien C, Munnich A, et al. CTG trinucleotide repeat “big jumps”: large expansions, small mice. *PLoS Genet* 2007; 3: e52.
- Gomes-Pereira M, Monckton DG. Chemical modifiers of unstable expanded simple sequence repeats: what goes up, could come down. *Mutat Res* 2006; 598: 15–34.
- Guiraud-Dogan C, Huguët A, Gomes-Pereira M, Brisson E, Bassez G, Junien C, et al. DM1 CTG expansions affect insulin receptor isoforms expression in various tissues of transgenic mice. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772: 1183–91.
- Harper PS. *Myotonic dystrophy*. 3rd edn. London: WB Saunders; 2001.
- Huguët A, Medja F, Nicole A, Vignaud A, Ferry A, Guiraud-Dogan C, et al. Molecular, physiological and motor performance defects in DMSXL mice carrying >1000 CTG repeat from the human DM1 locus. *PLoS Genet* 2012; 8: e1003043.
- Izac SM, Eeg TR. Basic anatomy and physiology of sleep. *Am J Electroneurodiagnostic Technol* 2006; 46: 18–38.
- Jiang H, Mankodi A, Swanson MS, Moxley RT, Thornton CA. 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* 2004; 13: 3079–88.
- Kalsootra A, Xiao X, Ward AJ, Castle JC, Johnson JM, Burge CB, et al. A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 20333–8.
- Kanadia RN, Johnstone KA, Mankodi A, Lungu C, Thornton CA, Esson D, et al. A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 2003; 302: 1978–80.
- 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.
- Lee HW, Seo HS, Ha I, Chung SH. Overexpression of BACE1 stimulates spontaneous basal secretion in PC12 cells. *Neurosci Lett* 2007; 421: 178–83.
- Lin X, Miller JW, Mankodi A, Kanadia RN, Yuan Y, Moxley RT, et al. Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 2087–97.
- Lueck JD, Lungu C, Mankodi A, Osborne RJ, Welle SL, Dirksen RT, et al. Chloride channelopathy in myotonic dystrophy resulting from loss of posttranscriptional regulation for CLCN1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C1291–7.
- Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, Shutler G, Amemiya C, Jansen G, et al. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 1992; 255: 1253–5.
- Mankodi A, Takahashi MP, Jiang H, Beck CL, Bowers WJ, Moxley RT, et al. 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.
- Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, et al. CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci Rep* 2012; 2: 209.
- Meola G, Sansone V. Cerebral involvement in myotonic dystrophies. *Muscle Nerve* 2007; 36: 294–306.
- Meola G, Sansone V, Perani D, Colleluori A, Cappa S, Cotelli M, et al. Reduced cerebral blood flow and impaired visual-spatial function in proximal myotonic myopathy. *Neurology* 1999; 53: 1042–50.
- Meola G, Sansone V, Perani D, Scarone S, Cappa S, Dragoni C, et al. Executive dysfunction and avoidant personality trait in myotonic dystrophy type 1 (DM-1) and in proximal myotonic myopathy (PROMM/DM-2). *Neuromuscul Disord* 2003; 13: 813–21.
- Miller JW, Urbinati CR, Teng-Umuay P, Stenberg MG, Byrne BJ, Thornton CA, et al. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J* 2000; 19: 4439–48.
- Minnerop M, Weber B, Schoene-Bake JC, Roeske S, Mirbach S, Anspach C, et al. The brain in myotonic dystrophy 1 and 2: evidence for a predominant white matter disease. *Brain* 2011; 134 (Pt 12): 3530–46.
- Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Jiang YM, Huang Z, et al. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat Med* 2012; 18: 1136–41.
- Modoni A, Silvestri G, Pomponi MG, Mangiola F, Tonali PA, Marra C. Characterization of the pattern of cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1. *Arch Neurol* 2004; 61: 1943–7.
- Ono S, Takahashi K, Jinnai K, Kanda F, Fukuoka Y, Kurisaki H, et al. Loss of serotonin-containing neurons in the raphe of patients with myotonic dystrophy: a quantitative immunohistochemical study and relation to hypersomnia. *Neurology* 1998a; 50: 535–8.
- Ono S, Takahashi K, Jinnai K, Kanda F, Fukuoka Y, Kurisaki H, et al. Loss of catecholaminergic neurons in the medullary reticular formation in myotonic dystrophy. *Neurology* 1998b; 51: 1121–4.
- Orengo JP, Chambon P, Metzger D, Mosier DR, Snipes GJ, Cooper TA. 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 USA* 2008; 105: 2646–51.
- Osborne RJ, Lin X, Welle S, Sobczak K, O'Rourke JR, Swanson MS, et al. Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 1471–81.
- Panaite PA, Gantelet E, Kraftsik R, Gourdon G, Kuntzer T, Barakat-Walter I. Myotonic dystrophy transgenic mice exhibit pathologic abnormalities in diaphragm neuromuscular junctions and phrenic nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67: 763–72.
- Perbellini R, Greco S, Sarra-Ferraris G, Cardani R, Capogrossi MC, Meola G, et al. Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* 2011; 21: 81–8.
- Ranunc LP, Cooper TA. RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu Rev Neurosci* 2006; 29: 259–77.
- Rau F, Freyermuth F, Fugier C, Villemin JP, Fischer MC, Jost B, et al. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol* 2011; 18: 840–5.
- Robbins TW, Arnsten AF. The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annu Rev Neurosci* 2009; 32: 267–87.
- Romeo V, Pegoraro E, Squarzanti F, Soraru G, Ferrati C, Ermani M, et al. Retrospective study on PET-SPECT imaging in a large cohort of myotonic dystrophy type 1 patients. *Neurol Sci* 2010; 31: 757–63.

- Rosahl TW, Geppert M, Spillane D, Herz J, Hammer RE, Malenka RC, et al. Short-term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I. *Cell* 1993; 75: 661–70.
- Savkur RS, Philips AV, Cooper TA. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 2001; 29: 40–7.
- Schluter OM, Khvotchev M, Jahn R, Sudhof TC. Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling fusion. *J Biol Chem* 2002; 277: 40919–29.
- Schweizer MC, Henniger MS, Sillaber I. Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, 'anomalous anxiolysis' and activity. *PLoS One* 2009; 4: e4326.
- Sergeant N, Bombois S, Ghestem A, Drobecq H, Kostanjevecki V, Missiaen C, et al. Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *J Neurochem* 2003; 85: 1581–91.
- Seznec H, Agbulut O, Sergeant N, Savouret C, Ghestem A, Tabti N, et al. Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2717–26.
- Seznec H, Lia-Baldini AS, Duros C, Fouquet C, Lacroix C, Hofmann-Radvanyi H, et al. Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1185–94.
- Sistiaga A, Urreta I, Jodar M, Cobo AM, Emparanza J, Otaegui D, et al. Cognitive/personality pattern and triplet expansion size in adult myotonic dystrophy type 1 (DM1): CTG repeats, cognition and personality in DM1. *Psychol Med* 2010; 40: 487–95.
- Steidl EM, Neveu E, Bertrand D, Buisson B. The adult rat hippocampal slice revisited with multi-electrode arrays. *Brain Res* 2006; 1096: 70–84.
- Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 2004; 27: 509–47.
- Suenaga K, Lee KY, Nakamori M, Tatsumi Y, Takahashi MP, Fujimura H, et al. Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain. *PLoS One* 2012; 7: e33218.
- Sugita S. Human growth hormone co-transfection assay to study molecular mechanisms of neurosecretion in PC12 cells. *Methods* 2004; 33: 267–72.
- Tallent MK, Varghis N, Skorobogatko Y, Hernandez-Cuebas L, Whelan K, Vocadlo DJ, et al. In vivo modulation of O-GlcNAc levels regulates hippocampal synaptic plasticity through interplay with phosphorylation. *J Biol Chem* 2009; 284: 174–81.
- Timchenko NA, Cai ZJ, Welm AL, Reddy S, Ashizawa T, Timchenko LT. RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem* 2001; 276: 7820–6.
- Wang GS, Kearney DL, De Biasi M, Taffet G, Cooper TA. Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 2007; 117: 2802–11.
- Wang X, Wang Q, Yang S, Bucan M, Rich MM, Engisch KL. Impaired activity-dependent plasticity of quantal amplitude at the neuromuscular junction of Rab3A deletion and Rab3A earlybird mutant mice. *J Neurosci* 2011; 31: 3580–8.
- Weber YG, Roebeling R, Kassubek J, Hoffmann S, Rosenbohm A, Wolf M, et al. Comparative analysis of brain structure, metabolism, and cognition in myotonic dystrophy 1 and 2. *Neurology* 2010; 74: 1108–17.
- Werner FM, Covenas R. Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in major depression: a review. *Int J Neurosci* 2010; 120: 455–70.
- Winblad S, Lindberg C, Hansen S. Temperament and character in patients with classical myotonic dystrophy type 1 (DM-1). *Neuromuscul Disord* 2005; 15: 287–92.

# Synaptic protein dysregulation in myotonic dystrophy type 1

## Disease neuropathogenesis beyond missplicing

Oscar Hernández-Hernández,<sup>1,2,†</sup> Géraldine Sicot,<sup>1,3,†</sup> Diana M. Dinca,<sup>1,3</sup> Aline Huguet,<sup>1,3</sup> Annie Nicole,<sup>1,3</sup> Luc Buée,<sup>4</sup> Arnold Munnich,<sup>1,3</sup> Nicolas Sergeant,<sup>4</sup> Geneviève Gourdon<sup>1,3</sup> and Mário Gomes-Pereira<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Inserm U781; Hôpital Necker Enfants Malades; Paris, France; <sup>2</sup>Laboratorio de Medicina Genómica; Departamento de Genética; Instituto Nacional de Rehabilitación; Calzada México Xochimilco, México; <sup>3</sup>Université Paris Descartes—Sorbonne Paris Cité; Institut *Imagine*; Paris, France; <sup>4</sup>Inserm U837-1; Alzheimer and Tauopathies; Université Lille Nord de France; Centre Jean Pierre Aubert; Lille, France

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

**Keywords:** myotonic dystrophy type 1, trinucleotide repeat expansion, RNA toxicity, RNA splicing, central nervous system, transgenic mice, synaptic function, synaptic protein, RAB3A, synapsin 1

**Abbreviations:** CELF, CUGBP/Elav-like factor; CUGBP, CUG RNA binding protein; DM, myotonic dystrophy; DM1, myotonic dystrophy type 1; DMPK, DM protein kinase; MBNL, muscleblind-like; RAB, RAS oncogene family; UTR, untranslated region

Submitted: 05/17/13

Revised: 06/24/13

Accepted: 06/25/13

Citation: Hernández-Hernández O, Sico G, Dinca DM, Huguet A, Nicole A, Buée L, et al. Synaptic protein dysregulation in myotonic dystrophy type 1: Disease neuropathogenesis beyond missplicing. *Rare Diseases* 2013; 1:e25553; <http://dx.doi.org/10.4161/rdis.25553>

\*Correspondence to: Mário Gomes-Pereira; Email: [mario.pereira@inserm.fr](mailto:mario.pereira@inserm.fr)

Addendum to: Hernández-Hernández O, Guiraud-Dogan C, Sicot G, Huguet A, Lullier S, Steidl E, et al. Myotonic dystrophy CTG expansion affects synaptic vesicle proteins, neurotransmission and mouse behaviour. *Brain* 2013; 136:957-70; PMID:23404338; <http://dx.doi.org/10.1093/brain/aws367>

**T**he toxicity of expanded transcripts in myotonic dystrophy type 1 (DM1) is mainly mediated by the disruption of alternative splicing. However, the detailed disease mechanisms in the central nervous system (CNS) have not been fully elucidated. In our recent study, we demonstrated that the accumulation of mutant transcripts in the CNS of a mouse model of DM1 disturbs splicing in a region-specific manner. We now discuss that the spatial- and temporal-regulated expression of splicing factors may contribute to the region-specific spliceopathy in DM1 brains. In the search for disease mechanisms operating in the CNS, we found that the expression of expanded CUG-containing RNA affects the expression and phosphorylation of synaptic vesicle proteins, possibly contributing to DM1 neurological phenotypes. Although mediated by splicing regulators with a described role in DM1, the misregulation of synaptic proteins was not associated with missplicing of their coding transcripts, supporting the view that DM1 mechanisms in the CNS have also far-reaching implications beyond the disruption of a splicing program.

### Myotonic Dystrophy and the Central Nervous System

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is the most common form of inherited muscular dystrophy in adults, with a worldwide

incidence of 1 in 8,000 individuals. DM1 is a typical multisystemic disease, affecting a large number of tissues and organs in the human body.<sup>1</sup> The central nervous system (CNS) is compromised to different extents in adult, juvenile and congenital forms of the disease. Several neuropsychological symptoms have been reported in adult-onset DM1 patients, such as excessive daytime sleepiness and fatigue, visuoconstructive impairment, attention deficits, reduced initiative and apathy, increased anxiety and anhedonia, as well as reduced intelligence quotients. Marked mental retardation and delayed psychomotor development are found in the congenital cases.<sup>2</sup> In addition to the clinical evidence, imaging and histopathological techniques have also illustrated brain dysfunction in DM1. MRI scans have revealed that white and gray matter are affected in DM1 brains, while PET-SPECT imaging techniques revealed deficits in brain glucose metabolism and hypoperfusion.<sup>3,4</sup> The histopathological distribution of tau protein in the brain revealed the accumulation of pathogenic protein isoforms in DM1 individuals,<sup>5</sup> in association with changes in the alternative splicing of tau transcripts,<sup>6</sup> resulting in the classification of DM1 as a tauopathy.

The neurological manifestations of the disease are highly debilitating and have a tremendous impact on the quality of life of DM1 patients and their families. As a result of their intellectual impairment and



behavioral deficits, DM1 patients experience low education achievements, low employment, poor familial environment, as well as social, economic and material deprivation.<sup>7</sup>

### Unraveling the Molecular Mechanisms of DM1 in the CNS

DM1 is caused by the abnormal expansion of a non-coding CTG trinucleotide repeat in the 3'UTR of the *DMPK* gene.<sup>8</sup> Experimental evidence supports a prevailing model of disease pathogenesis, in which the DM1 phenotype is mainly mediated by a deleterious gain-of-function of expanded *DMPK* transcripts.<sup>9,10</sup> CUG repeat-containing expanded transcripts form secondary RNA structures that bind to and sequester muscleblind-like proteins (MBNL) into ribonuclear inclusions or nuclear RNA foci,<sup>11</sup> and upregulate the CUG/Elav-like family (CELF) proteins.<sup>12</sup> Given the antagonistic role of MBNL and CELF proteins in the control of a developmentally regulated splicing program, CUG-associated RNA toxicity results in the aberrant expression of embryonic isoforms in adult skeletal muscle and heart.<sup>12,13</sup> Typical DM1 symptoms, such as myotonia, muscle weakness and insulin resistance, are explained by abnormal splicing of the *CLCN1* chloride channel,<sup>14,15</sup> *BINI* bridging integrator protein<sup>16</sup> and the insulin receptor,<sup>17</sup> respectively. Although splicing defects have been described in human DM1 brains,<sup>18</sup> we do not understand the functional impact of *MAPT/TAU*, *GRIN1/NMDAR1* and *APP* RNA missplicing in DM1 neuropathophysiology. Nor do we know the cell populations, neuronal circuits, molecular pathways and neurological functions that are primarily disturbed in DM1 brains.

In addition to spliceopathy, evidence has shown that additional elements may contribute to (or at least modify) disease pathogenesis, such as chromatin rearrangements within the DM1 locus, leaching of transcription factors away from active chromatin, dysregulated miRNA metabolism, altered protein translation, and accumulation of toxic peptides resulting from non-conventional repeat-associated RNA translation.<sup>9,10</sup>

### Recreating RNA Toxicity in the CNS of DM1 Transgenic Mice

Given the compromised function of the CNS in DM1 patients and the impact of the neurological symptoms on their daily life, a growing effort has been made to unravel the mechanisms of DM1 neuropathogenesis over the last few years. We have been tackling this question by using DMSXL transgenic mice, previously generated in our laboratory.<sup>19,20</sup> These animals carry a large fragment of the human DM1 locus containing more than 1000 CTG repeats in the 3'UTR of the *DMPK* gene. Homozygous DMSXL mice produce sufficient toxic RNA transcripts to reproduce some critical and highly relevant molecular features of DM1, such as RNA foci accumulation and missplicing, as well as muscle phenotypes.<sup>21</sup> In order to investigate whether RNA toxicity extended to the CNS, we have studied nuclear RNA foci accumulation and found CUG-containing ribonuclear inclusions in DMSXL mice, not only in the brain, but also in the spinal cord.<sup>22</sup> RNA foci were particularly abundant in the frontal cortex and in some neuronal nuclei of the brainstem—two brain regions that are considered to play critical roles in the development of some of the most characteristic neurological symptoms of DM1. The nuclear accumulation of toxic RNA foci was associated with sequestration of MBNL proteins, upregulation of CELF proteins and resulted in the disruption of alternative splicing in DMSXL frontal cortex and brainstem.<sup>22</sup>

While most of the exons misspliced in DMSXL brains were previously reported as misregulated in post-mortem DM1 brains,<sup>6,18</sup> the missplicing of *GRIN1/NMDAR1* exon 21, *MBNL1* and *MBNL2* exon 7 in human patients was poorly documented. To confirm that the splicing changes of these exons in DMSXL mice recreate relevant molecular events characteristic of DM1, we have now validated these abnormalities in human DM1 frontal cortex and brainstem. The RT-PCR analysis confirmed increased inclusion of *GRIN1/NMDAR1* exon 21, *MBNL1* exon 7 and *MBNL2* exon 7 in human DM1 frontal cortex and brainstem, relative to non-DM1 control individuals

(Fig. 1A), suggesting that the DMSXL splicing changes detected mimic true DM1 molecular features. Our RT-PCR analysis also revealed that missplicing was more pronounced in human frontal cortex than in brainstem, particularly for *MBNL1* and *MBNL2* transcripts. Coincidentally, the missplicing of *Mbnl1* and *Mbnl2* are among the most noticeable and reproducible defects detected in the brain of DMSXL mice, and may provide useful molecular biomarkers for the pre-clinical assessment of therapies aiming to correct DM1-spliceopathy in the CNS.

The extent and nature of the spliceopathy in DMSXL brains is region-specific, as illustrated by *Grin1/Nmdar1* transcripts. *Grin1/Nmdar1* exon 5 is abnormally excluded in DMSXL brainstem (but not in frontal cortex), while exon 21 is abnormally excluded in DMSXL frontal cortex (while it remains unaffected in brainstem).<sup>22</sup> The regional splicing defects of this gene (and others) might be the consequence of a spatially regulated splicing program. In support of physiological region-specific mechanisms of splicing regulation, we have found that the distribution of *Grin1/Nmdar1* isoforms varied between frontal cortex and brainstem in wild-type animals: while exon 5 is preferentially included in brainstem, exon 21 shows a much higher inclusion ratio in frontal cortex.<sup>22</sup> These differences suggest that the levels and/or activity of the key splicing regulators that control these events vary between different brain territories. We have addressed this hypothesis and found higher levels of CELF1 and CELF2 proteins in adult frontal cortex than in brainstem of wild-type mice. In contrast, the levels of MBNL proteins were higher in brainstem than in frontal cortex.<sup>22</sup> Additionally, the distribution of MBNL2 protein isoforms differed significantly between frontal cortex and brainstem: western blot immunodetection following long electrophoresis migration revealed high molecular weight isoforms that were specifically present in frontal cortex, as well as a higher expression of low molecular weight isoforms in brainstem (Fig. 1B). Given the role of CELF and MBNL proteins in the control of alternative splicing in the CNS,<sup>23-25</sup> these

differences may contribute to the regional splicing profiles in wild-type brains, and to the region-specific susceptibility of alternative exons to the accumulation of toxic RNA transcripts in DMSXL mice. Consistent with this view, a role of CELF2 in the regional regulation of alternative splicing in the mouse brain has been previously reported.<sup>26</sup> Our data suggest that the regional distribution of different splicing isoforms in the brain is regulated by the interplay between multiple RNA-binding proteins, which include not only CELF family members, but also MBNL proteins.

Missplicing in DMSXL CNS was not confined to frontal cortex and brainstem areas of the brain, and it was found throughout the CNS to a variable extent, including the hippocampus<sup>22</sup> and spinal cord (Fig. 1C), among other regions. These results demonstrate that CUG toxicity operates throughout the entire CNS. In agreement with this view, signs of neuropathy, the expression of pathological forms of MAPT/tau protein and a reduced number of lumbar motor neurons were reported in the spinal cord of DMSXL mice.<sup>27</sup> However, the correlation between histopathology and splicing dysregulation in spinal cord remains to be further explored.

### Expression of Splicing Regulators is Regulated during Mouse CNS Development

The missplicing events detected in DMSXL brains increased the expression of embryonic splicing profiles in adult animals, to a limited extent,<sup>22</sup> as previously reported in skeletal muscle and heart.<sup>12,13</sup> To gain insight into the mechanisms underlying the developmental splicing program in the CNS, we have studied the steady-state levels of MBNL and CELF proteins throughout brain development and aging in wild-type mice. We found that CELF1 and CELF2 protein levels experienced a pronounced decrease in brainstem. In the frontal cortex, however, only CELF1 displayed a very mild decrease from embryonic day 12.5 (E12.5) onwards. In contrast, MBNL1 and MBNL2 levels increased significantly in adult frontal cortex and brainstem, particularly between post-natal day eight (P8)

and the first month of age (M1). MBNL1 and MBNL2 were hardly detected in embryonic stages and at post-natal day 1 (P1) even following long exposures (Fig. 1D). The dramatic change in MBNL1 levels at one month of age coincided with a striking switch in the splicing patterns of *Mbnl1* and *Ldb3/Cypher* transcripts previously detected.<sup>22</sup> This is not surprising, since the alternative splicing of the alternative exons in these genes is specifically regulated by MBNL1.<sup>28</sup> In contrast, the splicing profile of *Fxr1* (a gene specifically regulated by CELF1) showed a less pronounced developmental splicing transition,<sup>22</sup> possibly due to the mild changes in the levels of CELF1 throughout brain development.

More importantly, the analysis of CELF and MBNL protein levels throughout wild-type brain development and aging revealed that DM1-associated CELF upregulation (particularly in the brainstem), and the functional inactivation of MBNL proteins by sequestration into ribonuclear foci recreated an embryonic scenario, thereby contributing to the abnormal expression of embryonic isoforms in adult DMSXL brain tissues.

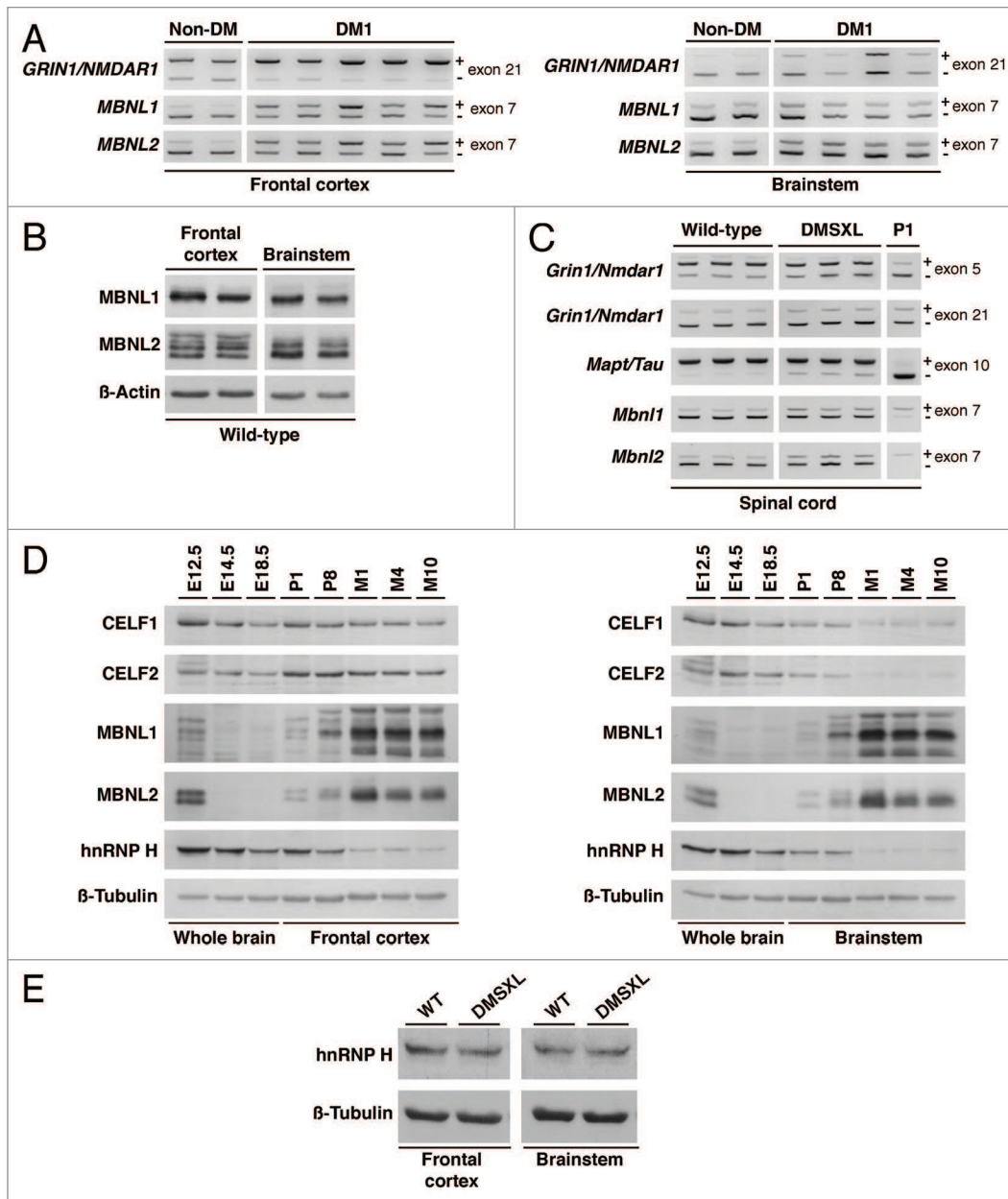
We have extended our analysis to the hnRNP H ribonucleoprotein, an alternative splicing regulator with a described role in DM1 spliceopathy.<sup>29</sup> hnRNP H steady-state levels exhibited a marked decrease from wild-type embryonic stages to adult ages, in both frontal cortex and brainstem to similar extent (Fig. 1D). In contrast to the upregulation of hnRNP H reported in DM1 myoblasts,<sup>29</sup> the steady-state levels of hnRNP H did not differ significantly between DMSXL and wild-type brain regions at one month of age (Fig. 1E).

### Changes in Synaptic Vesicle Proteins are not Associated with Missplicing

To identify dysfunctional disease intermediates and pathways behind CUG-associated brain dysfunction, we investigated the proteomic profile of DM1 transgenic mice and found abnormal RAB3A upregulation and synapsin I (SYN1) hyperphosphorylation relative to control animals. We extended our findings from mouse to human brains,

and confirmed a statistically significant RAB3A upregulation and SYN1 hyperphosphorylation in post-mortem DM1 frontal cortex.<sup>22</sup> Furthermore, higher RAB3A levels and SYN1 phosphorylation were also detected in neuronal-like PC12 cells expressing expanded CUG-containing transcripts. In these cells, the abnormal metabolism of synaptic vesicle proteins was associated with aberrant exocytosis, indicating a physiologically relevant consequence of the expression of toxic *DMPK* transcripts in neuronal cell lineages. Overall, we gathered electrophysiological, neurochemical, cellular and molecular data suggesting that the DM1 neuropsychological manifestations are mediated by the dysregulation of synaptic vesicle proteins, which likely affects neuronal vesicle release and exocytosis, and disrupts synaptic function in the CNS.

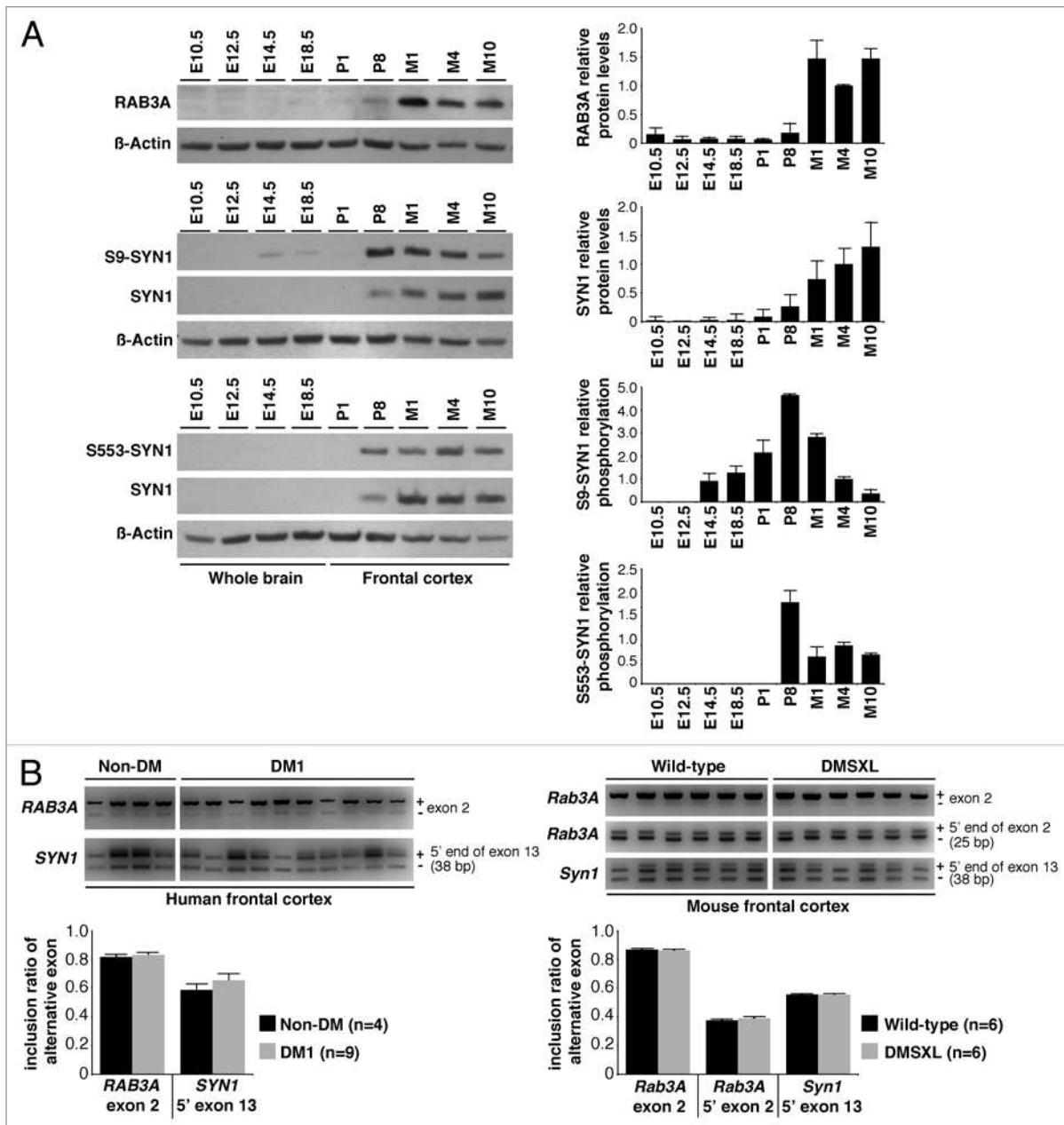
Since it has been suggested that DM1 molecular features, particularly splicing dysregulation, recreate embryonic events,<sup>13</sup> we asked whether synaptic protein expression and/or phosphorylation were also developmentally regulated. More importantly, we were interested in investigating whether RAB3A upregulation and SYN1 hyperphosphorylation in adult DMSXL mice recreated embryonic events, and supported a contribution of neurodevelopmental deficits behind DM1 neuropathology. To answer these questions, we studied protein expression and/or phosphorylation levels throughout wild-type brain development and aging (Fig. 2A). The analysis revealed that RAB3A levels increased at one month of age (M1), and indicated that RAB3A upregulation detected at four months of age did not mimic an embryonic expression profile, and it is unlikely to be a direct consequence of defective developmental regulation of this protein. Similarly, the total levels of SYN1 also showed a marked post-natal increase, particularly after one month of age. However, SYN1 phosphorylation at residues serine-9 and serine-553 preceded the pronounced increase in the steady-state levels of this protein. As a result, the phosphorylation of SYN1 appears to peak at post-natal eight (P8), but mainly as a result of the low steady-state of SYN1 at this stage (Fig. 2A). This situation differs from the SYN1



**Figure 1.** DM1-associated RNA spliceopathy and the expression of splicing regulators in the CNS. **(A)** Representative splicing analysis of candidate genes in the frontal cortex and brainstem of DM1 patients ( $n = 5$ ) and non-DM controls ( $n = 2$ ) by RT-PCR (Table S1). The alternative exons are indicated on the right of each panel. The higher molecular product results from the amplification of the transcript that includes the alternative exon (+); the lower band does not include the alternative exon (-). **(B)** Western blot analysis of MBNL1 and MBNL2 in the frontal cortex and brainstem of wild-type animals (Table S1), following long migration times to increase resolution and separation of protein isoforms.  $\beta$ -Actin was used as loading control. **(C)** Representative splicing analysis of alternative exons of *Grin1/Nmdar1*, *Mapt/Tau*, *Mbn1* and *Mbn2* by RT-PCR (Table S1) in the spinal cord of one-month-old DMSXL homozygous mice and wild-type controls ( $n = 3$ , per genotype). Newborn splicing profiles (P1) were determined in a cDNA pool prepared from three wild-type animals. Notably, DMSXL spinal cord exhibited increased exclusion of both *Grin1/Nmdar1* exon 5 and *Mapt/Tau* exon 10, as well as a mild increase in the inclusion of both *Mbn1* exon 7 and *Mbn2* exon 7. **(D)** Western blot analysis of splicing regulators throughout wild-type embryonic development (E12.5, E14.5, E18.5), in newborn (P1), postnatal day 8 (P8), and adult mice aged one (M1), four (M4) and 10 (M10) months (Table S2). Protein extracts from three individual animals were pooled for each developmental stage, electrophoresed and analyzed in three independent assays. Representative western blots are shown for frontal cortex and brainstem. Over-exposed of MBNL1 and MBNL2 western blots are shown to confirm low protein expression during embryonic stages and at P1. **(E)** Western blot analysis of hnRNP H in the frontal cortex and brainstem of DMSXL and wild-type animals at one month of age (Table S2), when missplicing dysregulation is more pronounced. Protein extracts from three individual animals of each genotype were pooled.  $\beta$ -Tubulin was used as loading control.

profiles in adult DMSXL mice, which show increased SYN1 phosphorylation but unchanged steady-state levels relative to wild-type control mice.<sup>22</sup> Therefore, we conclude that the hyperphosphorylation of SYN1 in adult DMSXL brains does not





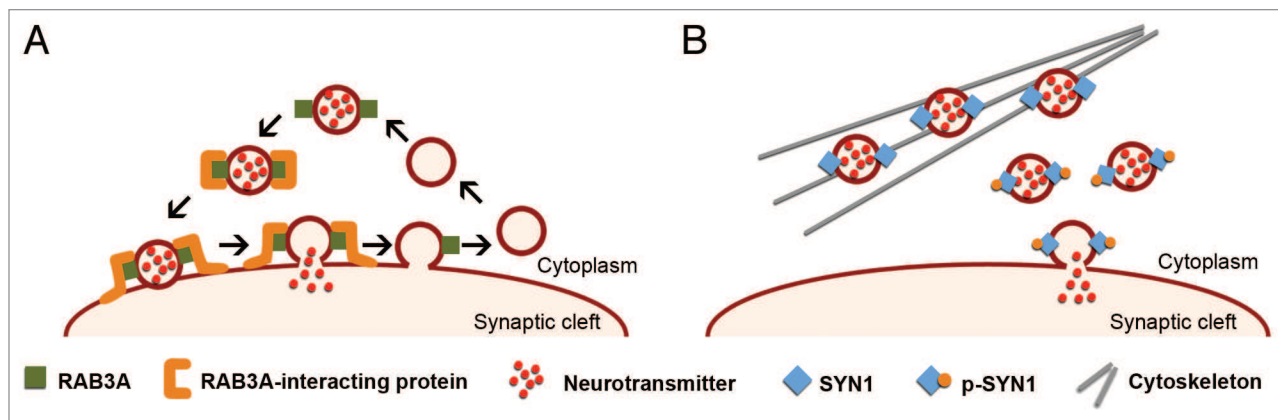
**Figure 2.** Expression, phosphorylation, and alternative splicing of RAB3A and SYN1. **(A)** Quantification of RAB3A steady-state levels and SYN1 phosphorylation throughout wild-type brain embryonic development (E10.4, E12.5, E14.5, E18.5), in newborn (P1), postnatal day 8 (P8), and adult mice aged one (M1), four (M4) and 10 (M10) months (Table S2). Frontal cortex protein extracts from three individual animals were pooled for each developmental stage and analyzed in two independent western blot assays (only one is shown). The graphs on the right represent the mean RAB3A and SYN1 steady-state levels ( $\pm$  SD) throughout the development and aging of mouse frontal cortex, as well as mean SYN1 phosphorylation on amino acid residues serine-9 (S9) and serine-553 (S553). **(B)** Representative RT-PCR splicing analysis of RAB3A exon 2 and the 5' end of SYN1 exon 13 in the frontal cortex of DM1 ( $n = 9$ ) and non-DM individuals ( $n = 4$ ), as well as in DMSXL and wild-type mice at four months of age ( $n = 6$ , each genotype) (Table S1). The 5' end of exon 2 of *Rab3A* is alternatively spliced only in mouse, and included in the analysis. The graphs show the mean inclusion ratio ( $\pm$  SEM) of each alternative exon or alternative 5' end.

truly mimic the early post-natal metabolism of this protein. In summary, our data are consistent with the view that DM1-associated RAB3A upregulation and SYN1 phosphorylation is more likely mediated by neurofunctional abnormalities, rather

than CUG-associated neurodevelopmental deficits.

To gain insight into the mechanisms of synaptic protein dysregulation, we studied additional mouse and cell models of DM1. We found that RAB3A was upregulated

in mouse brain in response to the inactivation of MBNL1, while SYN1 was hyperphosphorylated in PC12 cells overexpressing CELF1 or CELF2.<sup>22</sup> Given the role of MBNL and CELF protein families in the regulation of alternative splicing,



**Figure 3.** Schematic representation of the role of RAB3A and SYN1 in the dynamics of synaptic vesicles. **(A)** RAB3A is an abundant vesicle-associated protein that regulates synaptic efficiency. The reported functions of RAB3A in exocytosis range from docking and fusion of the synaptic vesicle to its subsequent recycling. RAB3A functions through a variety of interactions with multiple effector proteins. The upregulation of RAB3A likely perturbs the highly regulated vesicle dynamics and release, affecting neurotransmission and synaptic function in DM1. **(B)** SYN1 is expressed in mature neurons, where it associates with the cytoplasmic surface of synaptic vesicles. SYN1 regulates the supply of synaptic vesicles available for exocytosis by binding to both vesicles and actin cytoskeleton in a phosphorylation-dependent manner. Under resting conditions, non-phosphorylated SYN1 attaches synaptic vesicles to the actin cytoskeleton. Synaptic stimulation induces SYN1 phosphorylation that facilitates vesicle dissociation from cytoskeleton and potentiates exocytosis. Abnormal SYN1 hyperphosphorylation in DM1 likely dysregulates neuronal exocytosis and vesicle release.

and the prevalent role of RNA spliceopathy in the etiology of DM1, we sought to investigate whether RAB3A and SYN1 protein abnormalities were associated with missplicing of the corresponding transcripts. We initially studied the splicing profiles of the main alternative exons previously described in the literature and found no differences between DMSXL and wild-type mice at four months, an age when protein abnormalities were noticeable.<sup>22</sup> We have now extended this analysis to the remaining internal exons of the mouse and human genes. Our RT-PCR analysis confirmed additional splicing events in the *RAB3A* and *SYN1* genes previously described in the literature, such as the alternative inclusion of exon 2 in both human and mouse *RAB3A* transcripts; the inclusion of an additional 25-bp sequence through the use of an alternative 5' splice site in mouse *Rab3A* exon 2; and the inclusion of a short 38-bp sequence due to the use of an alternative 5' splice site of exon 13 in both human and mouse *SYN1* transcripts (Fig. 2B). Nevertheless, we did not detect significant splicing changes induced by the expression of toxic CUG-containing transcripts in mouse or human brains (Fig. 2B). Our data demonstrate that, although mediated by the inactivation of MBNL1 splicing regulator, RAB3A upregulation appears to be independent of missplicing events. Similarly,

even if SYN1 is hyperphosphorylated as a result of the upregulation of CELF1 and/or CELF2 splicing regulators, the splicing of *SYN1* transcripts remains unaltered. In summary, although involving the dysfunction of known splicing factors (such as MBNL and CELF family members), DM1 neuropathogenesis goes beyond the abnormal expression of embryonic splicing isoforms, and implicates other molecular mechanisms.

### Conclusion

DMSXL mice recreate relevant signs of RNA toxicity in the CNS, associated with behavioral, electrophysiological and neurochemical changes. In the search for the mechanisms and dysfunctional pathways behind these phenotypes, we found altered expression and phosphorylation of synaptic proteins, which are independent of splicing dysregulation. RAB3A is an abundant synaptic vesicle protein that regulates neurotransmission, through the interaction with other synaptic proteins that control vesicle fusion to the cell membrane.<sup>30</sup> SYN1 regulates neuronal vesicle release in a phosphorylation-dependent manner<sup>31</sup> (Fig. 3). As a result, RAB3A upregulation and SYN1 hyperphosphorylation disrupts synaptic function and neurotransmitter release, likely contributing to the cognitive and behavioral deficits of

DMSXL mice and the neuropsychological manifestations of DM1 patients.

### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflict of interest was disclosed.

### Acknowledgments

We are grateful to Amine Bouallague, the personnel of CERFE (Centre d'Exploration et de Recherche Fonctionnelle Expérimentale, Genopole, Evry, France) and LEAT (Laboratoire d'Expérimentation Animale et de Transgénése, Faculté de Médecine Paris Descartes) for attentively caring for the mice. We thank our colleagues at Inserm U781 and the DM1 French Splicing Network for helpful discussions. This work was supported by ANR (Agence Nationale de Recherche, France; project grant "DM1MICE"), AFM (Association Française contre les Myopathies, France; project grant number 14687), INSERM (Institute National de la Santé et Recherche Médicale, France) and Université Paris Descartes (Paris, France). O.H.H. was partially funded by a post-doctoral fellowship and research grant from CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico; grant number 183697). G.S. was awarded a PhD student fellowship from Ministère Français de la Recherche et Technologie.

## Supplemental Material

Supplemental materials may be found here: [www.landesbioscience.com/journals/rarediseases/article/25553](http://www.landesbioscience.com/journals/rarediseases/article/25553)

### References

1. Harper PS. Myotonic Dystrophy. WB Saunders, 2001.
2. Meola G, Sansone V. Cerebral involvement in myotonic dystrophies. *Muscle Nerve* 2007; 36:294-306; PMID:17486579; <http://dx.doi.org/10.1002/mus.20800>
3. Minnerop M, Weber B, Schoene-Bake JC, Roeske S, Mirbach S, Anspach C, et al. The brain in myotonic dystrophy 1 and 2: evidence for a predominant white matter disease. *Brain* 2011; 134:3530-46; PMID:22131273; <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awr299>
4. Romeo V, Pegoraro E, Squarzanti F, Sorarù G, Ferrati C, Ermani M, et al. Retrospective study on PET-SPECT imaging in a large cohort of myotonic dystrophy type 1 patients. *Neuro Sci* 2010; 31:757-63; PMID:20842397; <http://dx.doi.org/10.1007/s10072-010-0406-2>
5. Vermersch P, Sergeant N, Ruchoux MM, Hofmann-Radvanyi H, Watzte A, Petit H, et al. Specific tau variants in the brains of patients with myotonic dystrophy. *Neurology* 1996; 47:711-7; PMID:8797469; <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.47.3.711>
6. Sergeant N, Sablonnière B, Schraen-Maschke S, Ghestem A, Muraige CA, Watzte A, et al. Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 2001; 10:2143-55; PMID:11590131; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/10.19.2143>
7. Laberge L, Veillette S, Mathieu J, Auclair J, Perron M. The correlation of CTG repeat length with material and social deprivation in myotonic dystrophy. *Clin Genet* 2007; 71:59-66; PMID:17204048; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00732.x>
8. Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, et al. 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; PMID:1310900; [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90154-5](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(92)90154-5)
9. Sicot G, Gomes-Pereira M. RNA toxicity in human disease and animal models: From the uncovering of a new mechanism to the development of promising therapies. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832:1390-409; PMID:23500957; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbdis.2013.03.002>
10. Sicot G, Gourdon G, Gomes-Pereira M. Myotonic dystrophy, when simple repeats reveal complex pathogenic entities: new findings and future challenges. *Hum Mol Genet* 2011; 20(R2):R116-23; PMID:21821673; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddr343>
11. Miller JW, Urbinati CR, Teng-Umuay P, Stenberg MG, Byrne BJ, Thornton CA, et al. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J* 2000; 19:4439-48; PMID:10970838; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.17.4439>
12. Wang GS, Kearney DL, De Biasi M, Taffet G, Cooper TA. Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 2007; 117:2802-11; PMID:17823658; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI32308>
13. Lin X, Miller JW, Mankodi A, Kanadia RN, Yuan Y, Moxley RT, et al. Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 2006; 15:2087-97; PMID:16717059; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddl132>
14. Charlet-B N, Savkur RS, Singh G, Philips AV, Grice EA, Cooper TA. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* 2002; 10:45-53; PMID:12150906; [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00572-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00572-5)
15. Mankodi A, Takahashi MP, Jiang H, Beck CL, Bowers WJ, Moxley RT, et al. 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; PMID:12150905; [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00563-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00563-4)
16. Fugier C, Klein AF, Hammer C, Vassilopoulos S, Ivarsson Y, Toussaint A, et al. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med* 2011; 17:720-5; PMID:21623381; <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2374>
17. Savkur RS, Philips AV, Cooper TA. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 2001; 29:40-7; PMID:11528389; <http://dx.doi.org/10.1038/ng704>
18. Jiang H, Mankodi A, Swanson MS, Moxley RT, Thornton CA. 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* 2004; 13:3079-88; PMID:15496431; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddh327>
19. Seznec H, Lia-Baldini AS, Duros C, Fouquet C, Lacroix C, Hofmann-Radvanyi H, et al. Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability. *Hum Mol Genet* 2000; 9:1185-94; PMID:10767343; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/9.8.1185>
20. Gomes-Pereira M, Foiry L, Nicole A, Huguet A, Junien C, Munnich A, et al. CTG trinucleotide repeat "big jumps": large expansions, small mice. *PLoS Genet* 2007; 3:e52; PMID:17411343; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.0030052>
21. Huguet A, Medja F, Nicole A, Vignaud A, Guiraud-Dogan C, Ferry A, et al. Molecular, physiological, and motor performance defects in DMSXL mice carrying > 1,000 CTG repeats from the human DM1 locus. *PLoS Genet* 2012; 8:e1003043; PMID:23209425; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003043>
22. Hernández-Hernández O, Guiraud-Dogan C, Sicot G, Huguet A, Luillier S, Steidl E, et al. Myotonic dystrophy CTG expansion affects synaptic vesicle proteins, neurotransmission and mouse behaviour. *Brain* 2013; 136:957-70; PMID:23404338; <http://dx.doi.org/10.1093/brain/aws367>
23. Ladd AN. CUG-BP, Elav-like family (CELF)-mediated alternative splicing regulation in the brain during health and disease. *Mol Cell Neurosci* 2012; In press; PMID:23247071; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2012.12.003>
24. Charizanis K, Lee KY, Batra R, Goodwin M, Zhang C, Yuan Y, et al. Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron* 2012; 75:437-50; PMID:22884328; <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.029>
25. Suenaga K, Lee KY, Nakamori M, Tatsumi Y, Takahashi MP, Fujimura H, et al. Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain. *PLoS One* 2012; 7:e33218; PMID:22427994; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033218>
26. Zhang W, Liu H, Han K, Grabowski PJ. Region-specific alternative splicing in the nervous system: implications for regulation by the RNA-binding protein NAPOR. *RNA* 2002; 8:671-85; PMID:12022233; <http://dx.doi.org/10.1017/S1355838202027036>
27. Panaite PA, Kiehl M, Kraftsik R, Gourdon G, Kuntzer T, Barakat-Walter I. Peripheral neuropathy is linked to a severe form of myotonic dystrophy in transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2011; 70:678-85; PMID:21760538; <http://dx.doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182260939>
28. Kalsotra A, Xiao X, Ward AJ, Castle JC, Johnson JM, Burge CB, et al. A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:20333-8; PMID:19075228; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0809045105>
29. Paul S, Dansithong W, Kim D, Rossi J, Webster NJ, Comai L, et al. Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *EMBO J* 2006; 25:4271-83; PMID:16946708; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601296>
30. Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 2004; 27:509-47; PMID:15217342; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
31. Rosahl TW, Geppert M, Spillane D, Herz J, Hammer RE, Malenka RC, et al. Short-term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I. *Cell* 1993; 75:661-70; PMID:7902212; [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90487-B](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(93)90487-B)

## CHAPITRE V.

# Etude de l'implication du cervelet dans la neuropathogenèse de la DM1

### RESUME |

Les régions du cortex frontal, du tronc cérébral et de l'hippocampe sont jusqu'à alors les principales régions cérébrales étudiées dans la DM1 et ont toutes montré une susceptibilité variable à la toxicité ARN, illustrée par des défauts d'épissage plus ou moins importants selon les régions. Suite à la caractérisation d'un déficit moteur dépendant du cervelet dans les souris DMSXL, mes travaux de thèse se sont étendus au cervelet, une région, peu étudiée dans le mécanisme neuropathologique de la DM1. En effet, les souris DMSXL ont montré des anomalies électrophysiologiques qui confirment une dysfonction cérébelleuse. De façon intéressante, la population gliale de Bergmann du cervelet des souris DMSXL et des patients DM1 semble être particulièrement susceptible à l'accumulation des foci d'ARN et aux défauts d'épissage. Une approche protéomique globale a montré une possible dérégulation du métabolisme du glutamate, qui peut contribuer à la dysfonction du cervelet (ainsi que dans d'autres régions cérébrales), et donc à la neuropathogenèse de la DM1.

Annexe V. (Sicot *et al.* 2013, en préparation)

## I. INTRODUCTION : *LE CERVELET*

Dans la recherche de régions cérébrales et de circuits neuronaux particulièrement touchées par les expansions CTG, et suite à la caractérisation comportementale et électrophysiologique des souris DMSXL, je me suis intéressée à l'implication du cervelet dans la neuropathogenèse de la DM1. Même si cette région a déjà été impliquée dans d'autres maladies à triplets répétés, comme les SCAs, peu de choses sont connues sur le lien entre le cervelet et le mécanisme de la DM1. Seule une perte des cellules de Purkinje (Mizukami et al., 1999) ainsi qu'une baisse de la matière blanche (Minnerop et al., 2011) dans le cervelet de patients DM1 ont été décrites.

Ce chapitre présentera les données de comportement, électrophysiologiques et moléculaires suggérant une dysfonction cérébelleuse. Une brève introduction cytologique et fonctionnelle de cette région complexe du SNC sera faite pour une meilleure compréhension des résultats qui s'en suivront, et qui sont décrits en détail dans un manuscrit en préparation, à soumettre pour publication en Septembre 2013.

### I.1. Structure et organisation du cervelet

Situé sous le tronc cérébral, le cervelet est caractérisé par un parenchyme organisé en nombreux repliements. En considérant une division sagittale, il se constitue d'une partie médiane : le vermis et de deux formations latérales : les hémisphères. Les afférences du cervelet proviennent d'un part de la moelle, du tronc cérébral et des noyaux vestibulaires, et d'autre part de l'olive bulbaire, constituant respectivement les fibres moussues et les fibres grimpantes. Les efférences du cortex cérébelleux sont constituées par les axones des cellules de Purkinje qui atteignent directement les noyaux vestibulaires qui font relais au niveau des noyaux cérébelleux. Ainsi schématiquement, le cortex cérébelleux peut être considéré comme un système d'intégration avec deux voies d'entrée et une seule voie de sortie de l'information, et au centre de ce système la cellule de Purkinje (Glickstein et al., 2009 ; Glickstein et al., 2011 ; Voogd and Glickstein, 1998).

D'un point de vue histologique, le cervelet peut se diviser en trois couches : la couche moléculaire, la couche de Purkinje et la couche granulaire, où se connectent différents types de neurones. L'ensemble des connections synaptiques entre les différents types cellulaires est schématisé dans la Figure I.1. (Eccles, 1967 ; Goffinet, 1994 ; Manto, 2002).

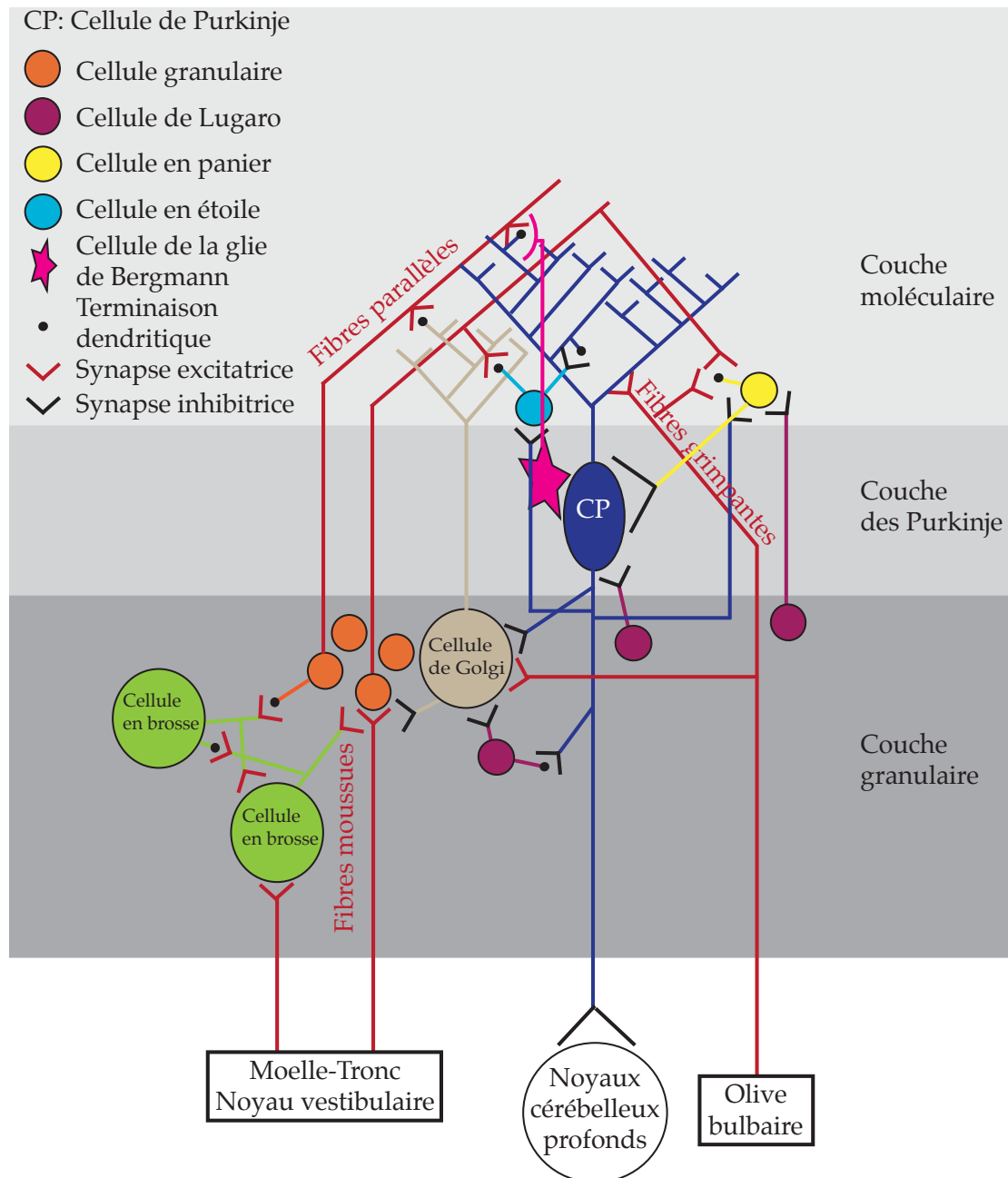


Figure I.1. Schématisation des principales connexions établies entre les différentes et principales populations cellulaires du cervelet.

### I.1.1. La population neuronale

Au niveau de la couche des Purkinje se trouve la cellule de Purkinje qui est souvent connue pour sa morphologie dendritique particulière et qui fait d'elle, une des cellules les plus reconnaissables du SNC. Une dysfonction de cette cellule caractéristique du cervelet a déjà été rapportée dans plusieurs SCAs (Clark et al., 1997 ; Daughters et al., 2009) et une perte du nombre des cellules de Purkinje a été observée chez un patient DM1 (Mizukami et al., 1999). C'est une grande cellule



d'environ 50 à 70 micromètres, considérée comme la sortie du cervelet et de ce fait, elle est l'unité d'intégration finale de cette région. En effet, elle va intégrer les signaux excitateurs venant d'une part des fibres grimpantes issues des neurones de l'olive bulbaire, et d'autre part des fibres parallèles issues de l'axone des grains situés dans la couche granulaire. Les signaux inhibiteurs eux proviennent principalement des cellules en étoile, des cellules en panier et des cellules de Lugaro. Puis, la cellule de Purkinje va projeter son axone inhibiteur sur les noyaux cérébelleux profonds (Eccles, 1967 ; Glickstein, 1998 ; Goffinet, 1994 ; Kandel, 2000 ; Manto, 2002).

La couche granulaire est principalement occupée par les grains ou cellules granulaires. Ces cellules reçoivent leur signal excitateur des fibres moussues et leurs axones, aussi nommés fibres parallèles, traversent une partie de la couche granulaire et moléculaire pour engager des contacts synaptiques avec l'arbre dendritique de la cellule de Purkinje. Ces cellules granulaires sont entre autres inhibées par les cellules de Golgi. A côté des grains et des cellules de Golgi, les cellules en brosse ou brosse unipolaire occupent également la couche granulaire. Ce type cellulaire a une action excitatrice sur la connexion grain/fibres moussues qui viennent des noyaux vestibulaires. Enfin, les cellules de Lugaro, qui inhibent la cellule de Golgi, les cellules en panier et les cellules de Purkinje, sont aussi localisées dans la couche granulaire (Eccles, 1967 ; Glickstein, 1998 ; Goffinet, 1994 ; Kandel, 2000 ; Manto, 2002)

La couche moléculaire se constitue de deux principaux types cellulaires neuronaux. Les cellules en panier, inhibées par les cellules de Lugaro et par les collatérales récurrentes de la cellule de Purkinje, sont excitées par les fibres grimpantes et parallèles. L'axone des cellules en panier va venir envelopper la cellule de Purkinje pour l'inhiber. Puis la cellule en étoile est également inhibée par les collatérales récurrentes de la cellule de Purkinje et excitée par les fibres parallèles. A son tour, elles inhibent les cellules de Purkinje (Eccles, 1967 ; Glickstein, 1998 ; Goffinet, 1994 ; Kandel, 2000 ; Manto, 2002).

### **I.1.2. La glie de Bergmann**

Dans le cervelet adulte, le soma des cellules de la glie de Bergmann se situe au niveau de la couche des Purkinje, directement apposé au soma des cellules de Purkinje alors que leurs fibres radiales peuvent se projeter jusqu'au niveau de la couche moléculaire. Il est dénombré environ 8 cellules de Bergmann pour une seule cellule de Purkinje. Ces cellules de la glie vont développer des protubérances latérales, aussi connues sous le nom de microdomaines, qui vont venir intimement entourer les synapses de la cellule de Purkinje. Cette association anatomique



représente un des sites majeurs de la communication entre ces deux types cellulaires. Les cellules de Bergmann, non excitables électriquement parlant, ont un rôle dans la distribution spatiale de l'ion potassium et servent à limiter l'étendue des signaux calciques suite à la stimulation des fibres parallèles et ce au sein du microdomaine. Ces cellules ont aussi un rôle primordial dans la recapture des neurotransmetteurs, tel que le glutamate. Par ces fonctions, les cellules de Bergmann peuvent influencer et moduler la transmission synaptique et la physiologie de la cellule de Purkinje (Bellamy, 2006 ; Wang et al., 2012).

## **I.2. Les fonctions du cervelet**

Les premières descriptions anatomiques de cette région datent de plus d'un siècle (Cajal, 1911), et ses fonctions ont donné lieu à de grandes controverses. En 20 ans, les fonctions de cette région sont passées du contrôle moteur des mouvements, à impliquées dans le langage, l'apprentissage et la mémoire, et les fonctions exécutives.

Les premières études sur l'animal ont permis d'attribuer un rôle de contrôle des mouvements au cervelet. En effet, des lésions de cette région résultent en une ataxie, une perte du tonus musculaire, une faiblesse musculaire, des tremblements, un manque de coordination et des anomalies des mouvements oculaires, rapportés dans les travaux de Luciani au cours du 19<sup>ème</sup> siècle (Glickstein et al., 2009 ; Glickstein, 1998 ; Voogd and Glickstein, 1998).

Les premières données expérimentales pour un rôle du cervelet dans les fonctions cognitives sont venues de l'imagerie et des études neuropsychologiques. Des études d'imagerie par résonance magnétique (IRM) ont révélé une activation du cervelet lors de l'exécution de tâches incluant l'attention, l'olfaction, le langage écrit et parlé, la mémoire verbale, la résolution de problèmes, la mémoire spatiale et épisodique, et les capacités d'apprentissage (Stoodley and Schmahmann, 2009). Schmahmann et Sherman avaient déjà observé des anomalies des tâches citées ci-dessus chez des patients avec une pathologie cérébelleuse. Ils avaient alors conceptualisé ces anomalies sous le terme de « cerebellar cognitive affective syndrome (CCAS) » (Schmahmann, 2004). Ce syndrome consiste en un déficit des fonctions exécutives, visuospatiales, des capacités du langage et du processus affectif. Schmahmann et ses collègues ont été plus loin dans cette conceptualisation et ont développé les bases théoriques du CCAS. Les déficits observés dans ce syndrome sont représentatifs de plusieurs domaines: contrôle de l'attention, contrôle de l'émotion, profil autistique et capacités sociales (Schmahmann, 1998 ; Schmahmann and Sherman, 1998 ; Schmahmann and Caplan, 2006 ; Schmahmann et al., 2007). Le

plus souvent, il est rapporté chez les patients le déficit d'une fonction d'un de ces domaines plutôt que le spectre complet du CCAS (Richter et al., 2007). Ce qui rend intéressant et pertinent l'étude de l'implication de cette région dans la neuropathogénèse de la DM1, c'est que des troubles de l'attention, des émotions, des capacités sociales et un profil autistique ont déjà été décrits chez les patients DM1 (Angeard et al., 2007 ; Angeard et al., 2011 ; Ekstrom et al., 2008 ; Kobayakawa et al., 2012 ; Meola et al., 2003 ; Steyaert et al., 1997 ; Steyaert et al., 2000). Il est possible qu'une dysfonction cérébelleuse participe à l'apparition de ces symptômes.

## II. RESULTATS

Les données expérimentales de ce chapitre sont rassemblées dans le manuscrit suivant :

**Sicot G, Prigogine C, Gall D, Medja F, Chuon C, Huguet A, Nicole A, Furling D, Guerrero C, Munnich A, Chéron G, Servais L, Gourdon G, Gomes-Pereira M.**

The molecular, electrophysiological and behavioural deficits in the cerebellum of a mouse model of myotonic dystrophy type I points to cell type-specific sensitivity to RNA toxicity.

Une version provisoire de ce manuscrit est présente en annexe V, en fin de ce chapitre. Les résultats récoltés seront brièvement résumés dans cette section et schématisés dans la Figure II.1.

Pendant la caractérisation comportementale des souris DMSXL, il a été remarqué, chez ces dernières, des anomalies de coordination motrice lors du test du runway, connu pour tester les capacités fonctionnelles du cervelet. Par la suite, des anomalies électrophysiologiques particulières de cette région, chez les souris DMSXL éveillées ont été enregistrées et ont démontré des anomalies cérébelleuses, plus précisément caractérisées par une hyperactivité générale du cervelet.

Les techniques de patch-clamp ont confirmé des déficits électrophysiologiques des cellules de Purkinje des souris DMSXL, qui présentent un seuil électrique d'activation plus faible que chez les souris contrôles, mais aussi une amplitude d'hyperpolarisation plus forte et un temps d'hyperpolarisation plus bas. De plus, la fréquence spontanée des cellules de Purkinje des souris DMSXL est significativement plus importante que chez les souris contrôles. L'ensemble de ces résultats suggère une hyperactivité de ces cellules et par conséquent du cervelet des

souris DMSXL. Ces données furent intrigantes car le cervelet n'était pas connu comme typiquement associé à la neuropathogenèse de la DM1. Pour explorer de manière plus approfondie l'implication de cette région et les mécanismes en jeu dans la DM1, des signes de la toxicité ARN, typiques de la maladie, ont été recherchés dans le cervelet des souris DMSXL et des patients DM1. L'accumulation de foci d'ARN associée à la co-localisation des protéines MBNL1 et MBNL2 a été détectée dans le cervelet des souris DMSXL et des patients DM1 adultes. De façon très intéressante, la présence de foci d'ARN a principalement été observée dans un type cellulaire précis, localisé autour des cellules de Purkinje et de nature gliale : les cellules de Bergmann. Afin de savoir si l'expression des ARNs toxiques et la séquestration des protéines MBNL1 et MBNL2, régulateurs de l'épissage alternatif au cours du développement, induisent des changements de l'épissage alternatif dans le cervelet des souris DMSXL, une analyse de l'épissage de certains transcrits a été réalisée. Des défauts d'épissage ont été détectés dans le cervelet de souris DMSXL comparés aux souris contrôles, à l'âge d'un mois. De plus, par la technique de microdissection laser, j'ai montré que des défauts d'épissage plus marqués sont détectés dans la population gliale riche en foci, en comparaison avec les cellules de Purkinje. Certaines anomalies d'épissage ont été validées dans le cervelet des patients DM1. Il semblerait donc que le cervelet reproduit également la splicéopathie caractéristique de la DM1.

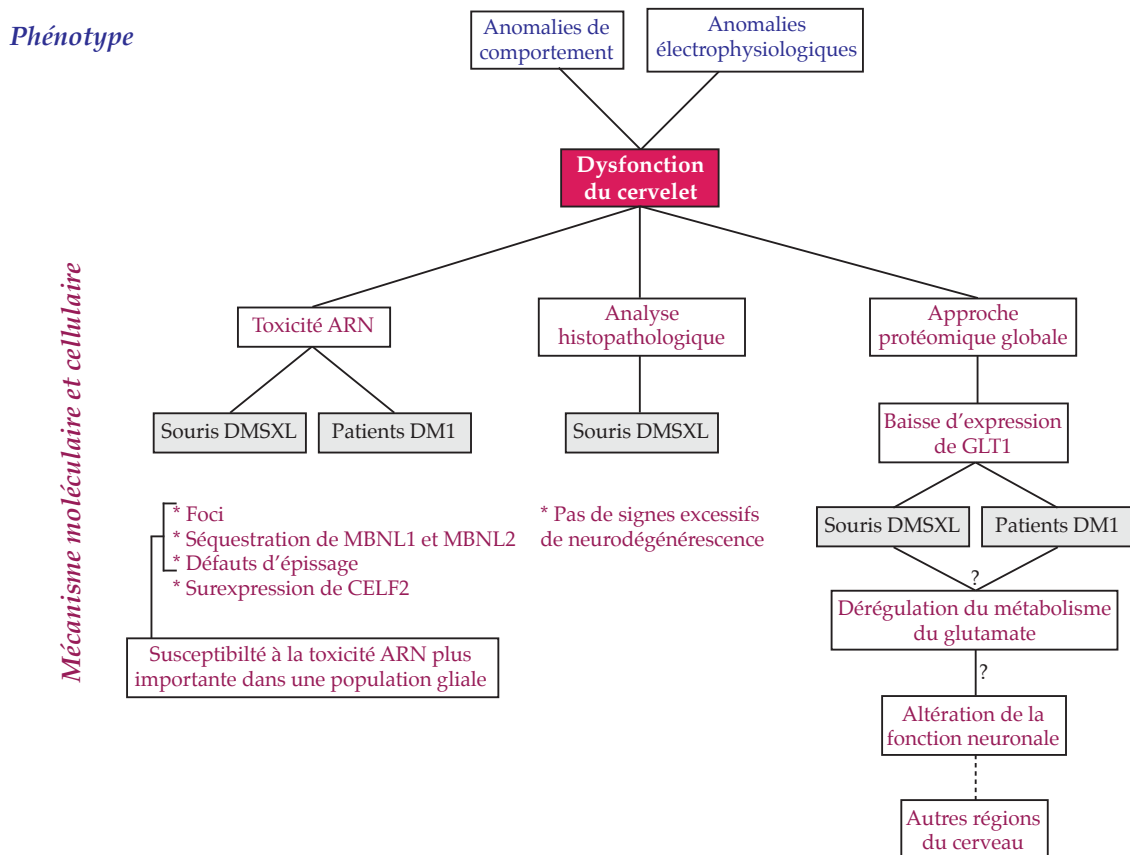
Puis, dans le but d'identifier les voies moléculaires perturbées dans le cervelet et qui pourraient contribuer aux anomalies de comportement et électrophysiologiques des souris DMSXL, une approche protéomique globale et quantitative a été réalisée et a permis de détecter la dérégulation de l'expression de plusieurs protéines. Parmi elles, la sévère baisse de l'expression du transporteur de glutamate EAAT2/GLT1 s'est avérée être une dérégulation intéressante dans sa possible contribution aux anomalies de comportement et électrophysiologiques du cervelet des souris DMSXL. Une sévère diminution de l'expression de EAAT2/GLT1 a aussi été détectée dans le cervelet des patients DM1, avec une très grande variabilité inter-individus. La baisse de l'expression de EAAT2/GLT1 a également été observée dans le tronc cérébral et le cortex frontal des souris DMSXL, et validée dans les mêmes régions des patients DM1. Enfin, cette diminution du niveau d'expression de EAAT2/GLT1 a été observée *in vitro* suite à l'expression des expansions CTG dans les cellules gliales C6, qui expriment de manière stable le transporteur de glutamate.

La baisse du niveau d'expression de EAAT2/GLT1 aurait pour conséquence une augmentation du glutamate dans l'espace synaptique, toxique pour les neurones et pouvant aller jusqu'à la mort neuronale. Cependant, aucun signe de mort cellulaire ou de neurodégénérescence n'a été détecté par analyse histologique du

cervelet des souris DMSXL

La diminution de EAAT2/GLT1 dans le cervelet est associée à une hyperphosphorylation de PKC $\alpha$ / $\beta$ . De façon intéressante, la phosphorylation de PKC $\alpha$ / $\beta$  est connue pour être impliquée dans la régulation de ce transporteur du glutamate.

L'ensemble de ces résultats suggère fortement, pour la première fois, une dysfonction du cervelet dans un modèle murin de la DM1 avec une susceptibilité à la toxicité ARN plus prononcée dans la glie de Bergmann que dans les cellules de Purkinje chez les souris DMSXL (Figure II.1). De plus, les résultats résumés ci dessus laissent penser à une dysfonction particulière de l'homéostasie du glutamate, pas seulement dans le cervelet, mais aussi dans d'autres régions du cerveau.



**Figure II.1. Schématisation des principaux résultats phénotypiques et moléculaires suggérant une dysfonction du cervelet dans la DM1.** Ces travaux se sont appuyés sur le modèle murin DMSXL et des échantillons de patients DM1.

### III. DISCUSSION

Des indications cliniques et neuropsychologiques ont révélé l'implication du SNC dans la DM1, et particulièrement dans les formes les plus sévères de la maladie (Ashizawa and Sarkar, 2011 ; Giubilei et al., 1999 ; Harper, 2001 ; Meola and Sansone, 2007 ; Ono et al., 1995 ; Romeo et al., 2010 ; Weber et al., 2010). Malgré ces récentes avancées, les bases moléculaires des manifestations neurologiques dans la DM1 sont toujours mal connues. Un de mes objectifs de thèse était donc d'explorer l'implication de différentes régions du cerveau dans la maladie. Pour cela, je me suis appuyée sur l'utilisation d'un modèle murin de la DM1 : le modèle DMSXL qui est un bon modèle pour étudier la neuropathogenèse de la DM1. En effet, il est le seul à exprimer le transcrit *DMPK* humain porteur des expansions CUG dans le système nerveux central et permet donc d'évaluer l'impact des répétitions CUG dans plusieurs territoires cérébraux. Egalement, l'évaluation du comportement de ces souris a révélé un certain nombre de déficits neurologiques dont certains sont retrouvés chez les patients DM1. En effet, les souris DMSXL présentent une anhédonie mais aussi un comportement compulsif et obsessionnel, des anomalies de la mémoire de travail et spatiale, associée à des anomalies de la transmission synaptique (Hernandez-Hernandez et al., 2013a). Les résultats obtenus pendant ma thèse en collaboration avec le Dr. Laurent Servais sont venus compléter le tableau phénotypique des souris DMSXL avec l'observation d'un déficit de la coordination motrice révélé lors du test du runway. Pour confirmer un dysfonctionnement de cette région cérébelleuse, des analyses électrophysiologiques ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr. Guy Chéron et du Dr. David Gall, et ont confirmé une atteinte du cervelet et des cellules de Purkinje chez les souris DMSXL.

Comme beaucoup de régions du cerveau, le cervelet présente de nombreux foci d'ARN dans les souris DMSXL et les patients DM1 à différents âges. En effet, un nombre important de foci d'ARN a majoritairement été détecté dans les cellules de Bergmann autour des cellules de Purkinje, et associé à une co-localisation des protéines MBNL1 et MBNL2 dans le cervelet des souris DMSXL âgées d'un mois. Un signal MBNL1 et MBNL2 diffus a été détecté au sein des cellules de Purkinje. Une situation similaire est observée dans le cervelet des patients DM1 adultes, où des foci d'ARN sont localisés dans les cellules avoisinantes des cellules de Purkinje et associés à la co-localisation de MBNL1 et MBNL2. Des foci ont aussi été observés dans les cellules de Purkinje, mais, de manière intéressante, le signal MBNL1 et MBNL2 est resté diffus dans les patients DM1. Ces données recourent de précédents résultats qui montraient également la présence de foci d'ARN de petite taille dans les cellules de Purkinje de sujets DM1, mais ils ne co-localisaient pas avec les protéines

MBNL (Daughters et al., 2009).

La différence entre l'accumulation de foci et séquestration de protéines MBNL entre les neurones de Purkinje et les cellules voisines, peut être expliquée par la faible expression du transcrit *DMPK* porteur des expansions CUG dans ce dernier type cellulaire, qui ne serait pas suffisante pour induire l'accumulation des agrégats ribonucléaires, la séquestration des protéines MBNL et l'apparition des défauts d'épissage. Cette hypothèse pourrait être testée en quantifiant le niveau d'expression du gène *DMPK* dans des cellules de Purkinje microdisséquées versus les cellules autour.

Pour l'instant, il n'y a pas de données sur l'expression des protéines MBNL dans les cellules de Purkinje. On peut donc imaginer une deuxième hypothèse pour expliquer l'absence de co-localisation des protéines MBNL dans cette population neuronale. Il est possible que les cellules de Purkinje expriment des isoformes protéiques particulières de MBNL1 et MBNL2 qui présentent une affinité réduite pour les répétitions CUG du transcrit de *DMPK* amplifié. Cela pourrait être dû, par exemple, à l'exclusion de un ou plusieurs domaines en doigt de zinc, responsables de la liaison des protéines MBNL aux acides nucléiques (Terenzi and Ladd, 2010). Ces deux hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives et peuvent toutes les deux jouer un rôle dans les cellules de Purkinje et expliquer l'absence des foci et l'inactivation des protéines MBNL dans ce type de neurones.

Sans écarter la responsabilité de la cellule de Purkinje dans l'atteinte cérébelleuse observée chez les souris DMSXL, mon intérêt s'est tout de même porté sur la population cellulaire proche des cellules de Purkinje et contenant de nombreux foci chez les souris DMSXL et les patients DM1. En effet, à la vue de la distribution particulière des foci d'ARN associée à une co-localisation des protéines MBNL1 et MBNL2, le type cellulaire entourant les cellules de Purkinje semble être particulièrement affectée par la toxicité des expansions CTG. Par différents marquages neuronaux, cette population cellulaire correspond à la glie de Bergmann. Dans le cervelet, les cellules de la glie de Bergmann, localisées autour du soma des cellules de Purkinje, sont étroitement liées à ces dernières, par la formation d'un manchon englobant les synapses développées par la cellule de Purkinje (Bellamy, 2006). Les cellules de la glie de Bergmann développent donc une intime interaction avec les cellules de Purkinje, et par conséquent, agissent sur de nombreux aspects biologiques, tels que la migration neuronale, la différenciation neuronale, la transmission synaptique ainsi que la plasticité synaptique (Bellamy, 2006). Pour confirmer la susceptibilité à la toxicité de l'ARN de cette population gliale, présentant déjà un grand nombre de foci associé à la co-localisation des protéines MBNL1 et MBNL2, l'analyse de l'épissage alternatif de l'exon 7 de *Mbnl1* et *Mbnl2* a

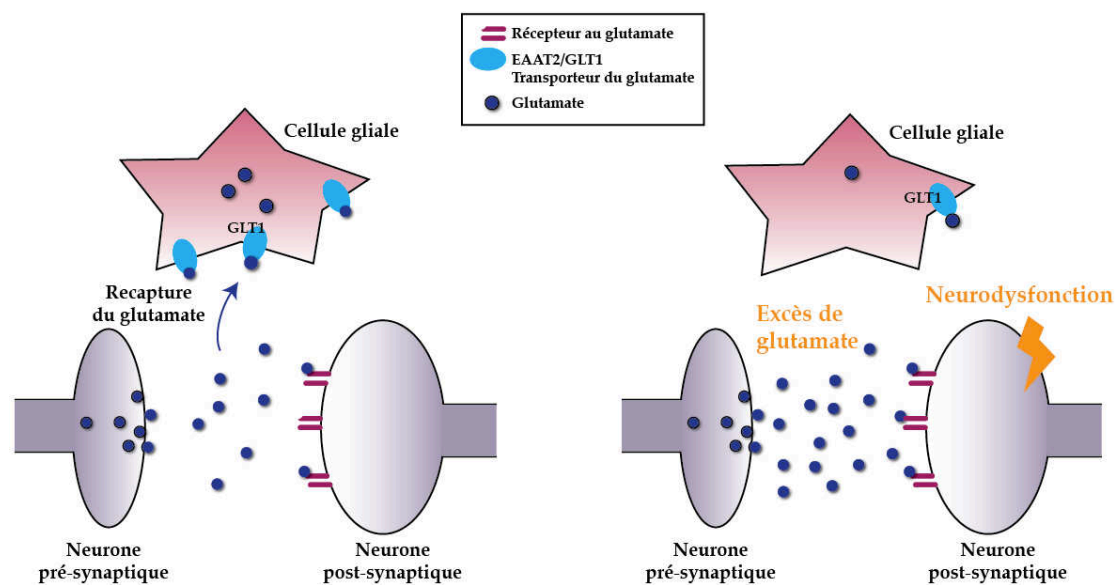
été réalisée sur les cellules de Bergmann microdisséquées, et comparée avec la population voisine des neurones de Purkinje. Comme prévu par l'accumulation des foci d'ARN et séquestration de MBNL1 et MBNL2, les défauts d'épissage sont plus prononcés dans les cellules de Bergmann, comparés aux neurones de Purkinje. Ces résultats démontrent une dérégulation de l'épissage dans la glie de Bergmann, suite à l'accumulation particulièrement prononcée des foci d'ARN toxiques. Les cellules de Bergmann se positionnent alors comme candidat pour expliquer les anomalies électrophysiologiques détectées dans les cellules de Purkinje des souris DMSXL.

Pour identifier des voies cibles des expansions CTG impliquées dans cette dysfonction du cervelet, une approche protéomique globale quantitative a été réalisée sur le cervelet de souris DMSXL. De cette analyse, il est ressorti un certain nombre de dérégulations protéiques dont celle d'un transporteur du glutamate (GLT1), aussi appelé *excitatory amino acid transporter 2* (EAAT2), aussi dénommé *solute carrier family 1 member 2* (SLC1A2). Une baisse significative de son niveau d'expression a été observée dans le cervelet des souris DMSXL, mais également dans le cortex frontal et le tronc cérébral, et validée dans le cortex frontal et le tronc cérébral des patients DM1. Une baisse significative de l'expression de GLT1 a aussi été observée dans le cervelet de six patients DM1 sur neuf. Ainsi, les souris DMSXL reproduisent un défaut d'expression de cet important transporteur de glutamate, observé chez les patients DM1. De plus, cette baisse a été reproduite *in vitro* après transfection avec les expansions CTG dans les cellules gliales C6, qui expriment la protéine GLT1 de manière stable. Ce résultat montre que la diminution d'expression de GLT1 est une conséquence directe de l'expression des répétitions CUG toxiques dans les cellules gliales, plutôt qu'une conséquence indirecte de la dérégulation globale de la physiologie cérébrale suite à la mutation DM1.

Le transporteur du glutamate GLT1 est exclusivement glial et est exprimé de manière importante dans le SNC. Sa fonction majoritaire est la recapture du neurotransmetteur L-glutamate libéré dans l'espace intersynaptique suite à un phénomène exciteur. Ce transporteur joue donc un rôle crucial dans la protection des neurones environnants contre une excitotoxicité due à un excès de glutamate extracellulaire. Une baisse du niveau d'expression du transporteur GLT1, comme observée dans le cerveau des souris DMSXL et des patients DM1, aurait pour conséquence une augmentation du glutamate dans l'espace intersynaptique, résultant en une dysfonction neuronale (Figure III.1.). Un taux extracellulaire de glutamate trop important, qui reste à être vérifié dans le cerveau des souris DM1 et des patients DM1, provoquerait une hyperexcitabilité des neurones, leur dysfonction et dans les cas les plus sévères la neurodégénérescence (Herman and Jahr, 2007 ; Kanai and Hediger, 2004 ; O'Shea, 2002), comme c'est le cas des souris inactivées



pour *Glh1* (Tanaka et al., 1997). Cependant, aucun signe de neurodégénérescence n'a été observé dans le cervelet des souris DMSXL. Les niveaux d'expression de GLT1 dans les souris DMSXL ne sont peut être pas assez réduits pour provoquer la mort cellulaire, mais le sont peut être pour entraîner une dysfonction neuronale des cellules voisines, notamment les cellules de Purkinje dans le cervelet, ou même d'autres populations neuronales du cerveau. En effet, il a été montré que les souris DMSXL montrent une augmentation de la susceptibilité aux crises chroniques induites par le PTZ (pentylentétrazol), comparable à l'excitabilité accrue du SNC des souris déficientes pour *Glh1* (Charizanis et al., 2012 ; Tanaka et al., 1997). Ainsi, la dérégulation de la voie métabolique du glutamate est une piste intéressante pour expliquer les anomalies neurologiques dans la DM1, pas seulement dans le cervelet, mais aussi dans d'autres régions cérébrales (Figure III.1.).



**Figure III.1. Schématisation des conséquences d'une possible dérégulation de la voie du glutamate.** Une baisse du niveau d'expression du transporteur GLT1, comme observée dans le cerveau des souris DMSXL et des patients DM1, aurait pour conséquence une augmentation du glutamate dans l'espace intersynaptique, résultant en une dysfonction neuronale.

Je me suis ensuite intéressée au mécanisme en cause dans la dérégulation de ce transporteur du glutamate. Un des messagers seconds qui régulent l'activité de GLT1 est PKC (Danbolt, 2001 ; Sims and Robinson, 1999). En effet, une activation de PKC a pour conséquence la baisse de l'expression à la surface cellulaire de GLT1, via un phénomène d'internalisation suivie d'une ubiquitination (Garcia-Tardon et al., 2012 ; Kalandadze et al., 2002). L'hyperphosphorylation de PKC $\alpha/\beta$  a déjà été détectée dans les muscles et le cœur suite à l'expression inductible des expansions toxiques CTG dans un modèle murin, ainsi que dans le cœur des patients DM1 (Kuyumcu-Martinez et al., 2007). J'ai donc décidé de vérifier si

l'hyperphosphorylation de PKC $\alpha/\beta$  a aussi lieu dans le SNC, et notamment dans le cervelet des souris DMSXL. De façon cohérente avec la diminution de l'expression de GLUT1, j'ai observé une hyperphosphorylation des formes PKC $\alpha/\beta$  dans le cervelet des souris DMSXL, ce qui argumente en faveur d'une dérégulation de l'expression de GLUT1 par la voie PKC, elle-même dérégulée en réponse à l'expression des expansions CTG. L'évaluation *in vitro* du niveau d'expression de GLUT1 en présence d'inhibiteurs de la phosphorylation de PKC $\alpha/\beta$  au sein des cellules transfectées avec les expansions CTG pourrait démontrer un lien direct entre l'activation de PKC et la dérégulation de GLUT1.

Le cervelet est une région complexe, traditionnellement classée comme impliquée dans la coordination motrice et l'équilibre, c'est-à-dire dans la coordination des mouvements volontaires et dans le maintien de la posture et de l'allure. Cependant, les fonctions du cervelet sont aussi liées à des tâches non-motrices à l'image du langage (Chen and Desmond, 2005), de l'anxiété (Sacchetti et al., 2005), de l'émotion (Parvizi et al., 2001) et d'autres (O'Halloran et al., 2012). Par conséquent, le cervelet semble influencer non seulement le contrôle moteur des mouvements mais aussi les aspects non-moteurs du comportement. En effet, il a des connections avec des zones corticales et sub-corticales non motrices associées au traitement de l'information de nature émotionnelle, incluant le cortex préfrontal et le système limbique (Strick et al., 2009). Bien que les problèmes de coordination et de posture ne soient pas des caractéristiques typiques de la DM1, il se peut que ces problèmes moteurs plus subtiles et donc subcliniques soient masqués par d'autres symptômes plus prédominants, comme la faiblesse musculaire ou la myotonie. L'implication du cervelet dans la pathophysiologie de la DM1 par ses fonctions non-motrices est plus facile à concevoir. En effet, les lésions cérébelleuses ont souvent été la cause d'anomalies cognitives et du comportement, regroupées sous le nom de CCAS, comme expliqué dans l'introduction (Schmahmann, 1998 ; Schmahmann and Sherman, 1998). Ce syndrome se caractérise par différents troubles cognitifs, tous rapportés chez les patients DM1, suggérant fortement une dysfonction du cervelet dans la neuropathogenèse de la DM1.

L'ensemble des données de ce chapitre suggère pour la première fois une dysfonction du cervelet, une dysfonction d'une population gliale et plus précisément une dysfonction de la voie du glutamate. Ces travaux positionnent alors cette voie métabolique comme une cible potentielle pour de futures stratégies thérapeutiques pour le système nerveux central. La prochaine étape serait de savoir si une augmentation du niveau d'expression de GLUT1 permettrait une réversion du profil électrophysiologique ainsi que du comportement dépendant du cervelet dans les souris DMSXL. Également, il serait pertinent d'étudier la dérégulation de GLUT1 dans

les autres régions du cerveau. Ces résultats apportent de nouvelles perspectives et de nouvelles données concernant le mécanisme de la DM1 dans le cerveau et mettent en lumière l'implication d'une région cérébrale, ignorée jusqu'à présent, dans la neuropathogenèse de la DM1.

# **The molecular, electrophysiological and behavioural deficits in the cerebellum of a mouse model of myotonic dystrophy type I point to cell type-specific sensitivity to RNA toxicity**

Géraldine Sicot<sup>1,2</sup>, Cynthia Prigogine<sup>3</sup>, David Gall<sup>3</sup>, Fadia Medja<sup>1,2</sup>, Cerina Chuon<sup>4</sup>, Aline Huguet<sup>1,2</sup>, Annie Nicole<sup>1,2</sup>, Arnold Munnich<sup>1</sup>, Chiara Guerrera<sup>4</sup>, Guy Cheron<sup>3</sup>, Laurent Servais<sup>3,5</sup>, Geneviève Gourdon<sup>1, 2</sup>, Mário Gomes-Pereira<sup>1, 2, 6</sup>

<sup>1</sup> Inserm U781, Hôpital Necker Enfants Malades, 75015 Paris, France.

<sup>2</sup> Université Paris Descartes – Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Paris, France.

<sup>3</sup> Laboratory of Neurophysiology and Movement Biomechanics, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium.

<sup>4</sup> Plateau Protéomes Necker, PPN, IFR94, Paris 75006, France.

<sup>5</sup> Corresponding author: mario.pereira@inserm.fr

**Running title:** Cerebellar dysfunction in myotonic dystrophy

**Key words:** myotonic dystrophy; transgenic mice; cerebellum; Bergmann glia; glutamate.

## INTRODUCTION

Expanded non-coding RNAs can exhibit a deleterious gain-of-function causing disease through abnormal interactions with RNA-binding proteins (Sicot and Gomes-Pereira, 2013). Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is the most common inherited neuromuscular disease is the prototypical example of RNA toxicity (Sicot *et al.*, 2011). It is a highly multisystemic disorder characterised by a wide range of clinical manifestations, such as myotonia, muscle weakness and wasting, cardiac arrhythmia, and other variable symptoms (Ashizawa and Sarkar, 2011; Harper, 2001). Given the variability in age of onset and clinical symptoms, four clinical forms of the disease have been considered: late, adult, childhood and congenital onset (Harper, 2001). Clinical evidence and neuropsychological assessment revealed the involvement of the central nervous system (CNS), especially in the most severe forms of the disease. Indeed, congenital DM1 is characterised by mental retardation, whereas the childhood-onset form is characterised by reduced IQ, low processing speed, as well as attention and executive deficits (Angeard *et al.*, 2007). Juvenile DM1 patients showed some features of the autism spectrum, such as abnormal social interaction and communication, and perform poorly at school, with a slow processing speed and visuo-spatial impairment (Angeard *et al.*, 2011). They are frequently diagnosed with attention deficit hyperactivity disorder and have emotional and behavioural problems, even prior to the onset of muscle symptoms (Steyaert *et al.*, 1997; Steyaert *et al.*, 2000). Although displaying some overlapping with the juvenile form, the symptoms of the adult form are generally variable and variable between individuals (Harper, 2001; Meola *et al.*, 2003; Meola and Sansone, 2007; Sansone *et al.*, 2007; Sistiaga *et al.*, 2009; Winblad *et al.*, 2006). The neurological manifestations of the disease, such as hypersomnia (a prevalent symptom in all clinical forms), are highly debilitating and have a tremendous impact on the quality of life of DM1 patients and their families (de Leon and Cisneros, 2008; Meola and Sansone, 2007). As a result of their intellectual impairment, DM patients experience low education achievements, low employment, poor familial environment, as well as social, economic and material deprivation (Gagnon *et al.*, 2010; Laberge *et al.*, 2007). The involvement of the brain in DM1 is also supported by histopathological changes such as cell loss, cytoplasmic neuronal inclusions, ubiquitin positive aggregates, neurofibrillary tangles and disordered neuronal migration (de Leon and Cisneros, 2008; Meola and Sansone, 2007). Imaging studies have revealed structural, metabolic and blood flow changes, which may contribute to the characteristic DM1 neuropsychological executive dysfunction

(Chang et al., 1993; Meola et al., 1999; Minnerop et al., 2011; Romeo et al., 2010).

DM1 is an autosomal dominant disease caused by the expansion of an unstable CTG repeat in the 3'UTR of the *DM protein kinase (DMPK)* gene (Brook et al., 1992). Expanded *DMPK* transcripts accumulate in nuclear RNA foci, affecting the levels and/or localisation of two splicing regulator families involved in alternative splicing throughout development: the muscleblind-like (MBNL) and CUGBP/Elav-like family (CELF) proteins, causing subsequent missplicing of downstream target genes in many tissues (Ranum and Cooper, 2006). The abnormal splicing of the chloride channel *CLCN1* and the integrator protein *BIN1* in the skeletal muscle are responsible for typical disease symptoms, such as myotonia and muscle wasting, respectively (Charlet et al., 2002; Fugier et al., 2011; Mankodi et al., 2002). Although missplicing of relevant genes has been reported in temporal cortex in DM1 patients (Charizanis et al., 2012; Jiang et al., 2004), we do not know the physiological contribution of these events to the neuropsychological manifestations of DM1. Nevertheless, additional events, other than deregulated alternative splicing, seem to contribute to disease pathogenesis, such as altered gene expression, miRNA and protein translation (Sicot et al., 2011). In line with this hypothesis, the overexpression of *RAB3A* and hyperphosphorylation of *SYN1* reported in DM1 mice and patients is unlikely mediated by splicing defects (Hernandez-Hernandez et al., 2013a; Hernandez-Hernandez et al., 2013b).

Most of the CNS research has concentrated on brain cortex, brainstem and hippocampus, based on the nature of DM1 neuropsychological symptoms. However, we do not know which brain regions, cell types, neuronal circuits and molecular pathways the disease primarily affects. In order to investigate the involvement of different brain regions in DM1 neuropathogenesis, we took advantage of the *DMSXL* transgenic mouse model, which carries more than 1000 CTG in 3'UTR of the *DMPK* gene, compared to the control *DM20* line that carries non-pathogenic 20-CTG tracts (Gomes-Pereira et al., 2007; Seznec et al., 2000). Homozygous *DMSXL* mice express enough toxic CUG-containing RNA under the control of the human *DMPK* promoter to develop important features of the disease, including nuclear RNA foci accumulation and missplicing in multiple tissues (Hernandez-Hernandez et al., 2013a; Huguet et al., 2012), which are associated with a multi-systemic phenotype. Indeed, muscle deficits (Huguet et al., 2012) have been observed, as well as relevant behavioural and electrophysiological abnormalities, indicative of the deleterious impact of expanded *DMPK* transcripts on presynaptic function (Hernandez-Hernandez et al., 2013a). Taken advantage of this animal tool to unravel the neuropathogenesis of DM1, we sought to study the regional impact of

DM1 in different areas of the brain and neurological pathways, in order to gain insight into the cellular populations, brain regions and molecular events particularly susceptible to the *trans*-dominant effect of toxic expanded RNAs in the CNS.



## MATERIALS AND METHODS

**Transgenic mice.** DMSXL transgenic mice were generated and genotyped as previously described. All DMSXL mice used for this work were homozygous, unless otherwise stated. Animal care and handling was performed according to the French and European legislations, and the ethical guidelines of the host institution.

**Tissue samples.** Mouse cerebellum tissues were microdissected at different ages and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Human cerebellum samples were collected from different laboratories and shipped to us by Dr. Yasuhiro Suzuki (Asahikawa Medical Center, Japan), Dr. Tohru Matsuura (Okayama University, Japan), Dr. Adolfo Lopez-de-Munain (Navarra University, Spain), Dr. Christopher Pearson (The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada). All experiments using human samples were approved by the Ethics Committees of the host institutions. Written informed consent specimen use for research was obtained from all patients.

### **Behavioural and electrophysiological assessment.**

*The runway test.* Motor coordination was examined by the runway test as previously described (Servais *et al.*, 2005). In this test, DMSXL ( $n=20$ ) and control ( $n=19$ ) mice, male and females included, ran along an elevated runway with low obstacles intended to impede progress. The runway was 100 cm long and 0,7 cm width. Obstacles being of 1 cm diameter wood rod and 0.7 cm width were placed every 10 cm along the runway. Mice were placed on one extremity of the runway and had to move along the runway to reach the other end. The number of slips of the right hind leg was counted. Each mouse underwent four trials per day during 5 consecutive days. The test was repeated following a test-free period of three weeks, over one day (four consecutive trials), to assess the learning capacity of mice.

*In vivo electrophysiological study in alert mice.* DMSXL ( $n=3$ ) and control mice ( $n=4$ ), aged from one to two months, were surgically prepared for chronic recording of neuronal activity in the cerebellum. The experimental session for extracellular recording of Purkinje Cells (PCs) activity and local field potential (LFP) analysis in the cerebellar cortex was performed as previously described (Cheron *et al.*, 2004). The strength of the rhythmicity was quantified with a rhythm index (Sugihara *et al.*, 1995).

*In vitro electrophysiological study (patch-clamp recording).* Purkinje cells current-clamp recordings in DMSXL mice ( $n=7$ ) and control mice ( $n=10$ ) were conducted as described (Cheron *et al.*, 2004) at one to two months of age.

**Fluorescent in situ hybridization (FISH).** Ribonuclear inclusions were detected with a 5'-Cy3-labelled (CAG)<sub>5</sub> PNA probe, as previously described (Huguet *et al.*, 2012).

**Immunofluorescence (IF) combined with FISH.** Immunofluorescence combined with FISH was performed as previously described (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2013a) (Antibody references and working dilutions are listed in Supplementary Table 1)

**RT-PCR analysis of alternative splicing.** Total RNA was extracted from half mouse cerebellum using a TRIZOL extraction protocol combined with a commercially available RNA Purification Kit, as previously described (Huguet *et al.*, 2012). cDNA synthesis and semi-quantitative RT-PCR analysis were performed as described elsewhere (Gomes-Pereira *et al.*, 2007; Hernandez-Hernandez *et al.*, 2013a) using oligonucleotide primers listed in Supplementary Tables 2 and 3. All samples were normalized to *TATA-binding protein (Tbp)*.

**Western blot analysis.** Total protein was extracted from 20-30 mg brain tissue sample using RIPA buffer (ThermoFisher Scientific; 89901), supplemented with 0.05% CHAPS (Sigma; C3023), 1x complete protease inhibitors (Roche; 04693124001), 1x Phospho STOP phosphatase inhibitors (Roche; 04693124001). Protein concentrations in the supernatants were determined using a Bio-Rad DC™ protein assay (Bio-Rad; 500-0114). Protein integrity was checked by Coomassie stain of a 10% SDS-polyacrylamide gel. Volumes corresponding to 30-60 µg of protein were mixed with Laemmli sample buffer and boiled for 5 min. Proteins were resolved in 10% or 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto PVDF membranes. Following Ponceau red staining to verify the efficiency of protein transfer, membranes were blocked in 1X TBS-T (10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20) containing blotto (Santa Cruz Biotech; sc2325) and incubated overnight at 4°C with the corresponding primary antibody. After three washes with 1X TBS-T, membranes were incubated at room temperature during 1 hr with the appropriated HRP-secondary antibody. Primary and secondary antibody references, working dilutions and blocking conditions are indicated in Supplementary Table 1. After washing with 1X TBS-T, antibody binding was visualized by chemiluminescence (PerkinElmer). Densitometric analysis with Quantity One® 1D Analysis Software (Bio-Rad) has been performed to quantify signal intensity.

**Laser Capture Microdissection (LCM).** Purkinje cells and surrounding cells were individually microdissected from one to two-month-old DMSXL and wild-type control mouse cerebellum, using a Palm Micro Beam (Carl Zeiss). RNA extraction, cDNA synthesis and RT-PCR analysis of candidate genes performed as previously described (Peixoto *et al.*, 2004). Oligonucleotide primer sequences are listed in Supplementary Table 4. Average of 100 Purkinje cells and 300 surrounding cells were separately collected in triplicate from three DMSXL mice and from three wild-type control mice. For each cDNA sample, three replicates of the RT-PCR reactions were performed.

**2 Dimensions Gel Electrophoresis.** Cerebellum tissues from one to two-month-old DMSXL and wild-type control mouse were extracted as previously described above. Seven centimeter linear ReadyStrips IPG strips (Bio-Rad; 163-2001) were loaded with 150 µg of proteins by passive rehydration overnight. Isoelectric focusing was performed on an IPGphor device (Pharmacia Biotech) and was carried out up to a total of 10 kVh. The IPG strips were rinsed thoroughly with distilled water, quickly dried on filter paper and focused proteins were reduced (50 mM Tris/HCl, pH 6.8, 6 M urea, 2% w/v SDS, 30% v/v glycerol, 2% w/v DTT) and alkylated (50 mM Tris/HCl, pH 6.8, 6 M urea, 2% w/v SDS, 30% v/v glycerol, 4.5% w/v iodacetamide) for 20 min each. Strips were then placed on top of 12% SDS polyacrylamide gel. The process of the second dimension has been performed as previously described.

**iTraq analysis.** The analysis of mouse brain proteome by isobaric tagging for relative and absolute quantifications (iTRAQ) mass spectrometry was performed on individual DMSXL and mice (n=2 per genotype) at one to two months of age. Proteins extract was prepared as previously described. Detailed protocol is described in Supplementary Material and Methods.

**Microscope and images processing.** Images were taken with a fluorescent microscope Zeiss ApoTome 2, using Zeiss 2011 software and were treated with ImageJ 1.45s software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

**Statistically analysis.** Statistical analyses were performed with Prism (GraphPad Software, Inc), SPSS (v14.0, SPSS Inc<sup>®</sup>), Statistica (v6.0, StaatSoft<sup>®</sup>) and/or Excel software. When two groups were compared, a two-tailed Student's *t*-test with equal or unequal variance was performed as appropriate. For ANOVA, if statistical

significance was achieved, we performed post-test analysis to account for multiple comparisons. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Statistical analyses of the differences between electrophysiological profiles of DMSXL and wild-type mice were performed using the Student's *t*-test and one-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures. Unless indicated otherwise, the results are presented as means  $\pm$  standard error of the mean ( $\pm$ SEM) per genotype group.

## RESULTS

### **Motor-coordination abnormalities of DMSXL mice suggest cerebellar dysfunction**

The design of the initial phenotyping of DMSXL mice was grounded on clinical data, thus concentrating primarily on aspects of behavioural and cognition that depend on frontal cortex and hippocampus, in order to assess the involvement of these brain regions in DM1 neuropathology (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2013a). However, since the detailed neuropathology of DM1 is not fully known, and given the wide expression of the transgene in DMSXL brains (Hernandez *et al.*, 2013), we did not limit our study to these brain areas and explored the susceptibility of other regions and neuronal circuits to the expression of toxic CUG RNA repeats.

The extended behavioural analysis of DMSXL mice included the assessment of cerebellum-dependent motor coordination, through the runway test. In this test, mice must run along an elevated runway with low obstacles intended to impede their progress. The test assesses motor coordination by the cerebellum, while limiting the influence of muscle performance on the final outcome. The number of slips of the right hind leg was counted and taken as a direct assessment of motor discoordination. DMSXL mice consistently showed a significantly higher number of hind leg slips over five consecutive days, relative to wild-type controls (Figure 1.A). The poor performance of DMSXL was noticeable from the first day of testing (4.7 versus 3.0 slips,  $p=0.029$ ), and the difference between genotypes accentuated as the tested progressed (2.2 slips versus 0.8 slips at day five,  $p<0.001$ ). These results indicate that DMSXL show motor impaired coordination and deficits in the fine tuning of movements, suggestive of cerebellum dysfunction.

The mean number of hind leg slips of wild-type mice decreased significantly from day one to day five (3.0 at day one, versus 0.8 at day five,  $p<0.001$ ). Similarly, the performance of DMSXL mice improved over the same period of time (4.7 slips at day one, versus 2.2 at day 5,  $p=0.004$ ), demonstrating that, although performing poorly, DMSXL mice do not show deficits in motor learning (Figure 1.A). Finally, we tested the retention of the cerebellum-dependent task, through the re-assessment of mice following a test-free period of three weeks. The number of hind leg slips of both wild-type and DMSXL mice was still significantly lower at day 26 relative to the initial score measured at day one (3 slips versus 0.78 slips for wild-type mice,  $p=1.97 \times 10^{-5}$ ; 4.7 slips versus 1.94 slips for DMSXL;  $p=0.01$ ). These results demonstrate that the retention of the cerebellum-dependent motor task is not affected in DMSXL mice.

### **Electrophysiological abnormalities of Purkinje cells in DMSXL cerebellum**

To confirm cerebellum dysfunction in response to the expression of toxic *DMPK* transcripts, we performed electrophysiological profiling of DMSXL cerebellum. *In vivo* cerebellum electrophysiological recordings (Figure 1.B) were performed on wild-type compared to DMSXL alert mice. Electrodes were positioned in the Purkinje cell layer, and recorded a significant increased frequency of simple spike firing rate of Purkinje cells (86 Hz versus 50 Hz,  $p=1.47 \times 10^{-4}$ ), as well as a significant higher rhythmicity (0.13 versus 0.07,  $p=0.02$ ) in DMSXL mice. These results demonstrate a hyperactivity of the DMSXL cerebellum in comparison with wild-type controls. The assignment of the abnormalities recorded to the Purkinje cells was solely based on the positioning of the electrodes. Thus, to confirm the origin of the cerebellar deficits, additional electrophysiological analysis were performed on Purkinje neurons, using the whole cell configuration of the patch-clamp technique, on acute cerebellar slices prepared from one-month-old DMSXL and wild-type mice (Figure 1.C). The threshold current was significantly lowered in DMSXL versus wild-type Purkinje cells (203 pA versus 275 pA,  $p<0.05$ ); while the frequency of the spontaneous activity of Purkinje cells was significantly increased in DMSXL acute cerebellar slices (11.42 Hz versus 4.78 Hz,  $p<0.05$ ). Finally, the action potential afterhyperpolarisation recovery time constant ( $\tau_{AHP}$ ) was significantly decreased in the DMSXL versus wild-type Purkinje cells (1.25 ms versus 0.7 ms,  $p<0.05$ ). Taken together, the combined *in vivo* and *in vitro* electrophysiological analysis of DMSXL cerebellum revealed significant abnormalities in the activity of Purkinje cells.

### **DM1 mouse and human cerebellum show cell-type specific RNA foci**

Accumulation of nuclear RNA foci is one of the initiating events in the molecular pathogenesis of DM1 (Sicot et al., 2011). We have then investigated whether motor coordination and Purkinje cell abnormalities were associated with the accumulation of RNA aggregates in DMSXL cerebellum. In particular, we investigated which cell types in the cerebellum were most susceptible to foci accumulation and RNA toxicity. Neurons in the cerebellar cortex are organized in three layers: the molecular layer contains the cell bodies of two types of inhibitory neurons (the stellate and basket cell); the granular layer comprises a large number of granule cells and a few large Golgi interneurons; the Purkinje layer consists of

the cell bodies of Purkinje cells and the Bergmann glia (Figure 2.A).

Fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) revealed the accumulation of toxic *DMPK* transcripts throughout the cerebellum of adult DMSXL mice. In spite of widespread toxic RNA aggregates, the highest foci content was consistently observed in a specific calbindin-negative cell population, located in the vicinity of Purkinje cells (Figure 2.B). Both MBNL1 and MBNL2 co-localised with the RNA foci in cells neighbouring Purkinje neurons. In contrast, MBNL1 and MBNL2 produced a diffuse staining in the nucleus and cytoplasm of Purkinje cells, even in those rare Purkinje neurons that displayed RNA foci (Figure 2.B). The analysis on human DM1 cerebellum confirmed a high RNA foci content in the vicinity of Purkinje neurons and the co-localisation of MBNL1 and MBNL2 (Figure 2.C). Although low, the frequency of RNA foci in human Purkinje cells was higher than in DMSXL Purkinje cells. Nevertheless, MBNL1 and MBNL2 remained diffuse throughout the nucleus and cytoplasm of foci-positive Purkinje cells (Figure 2.C), indicating that MBNL proteins isoforms expressed in this cell type are not extensively sequestered by expanded CUG repeats. In summary, the distinctive accumulation of toxic RNA transcripts typical of DM1 molecular pathogenesis appears to occur most particularly in a population of the Purkinje layer surrounding the Purkinje neurons, in the adult brain of both transgenic mice and human DM1 patients.

Given the intriguing regional distribution of RNA foci in adult DM1 and DMSXL brains, we sought to identify the foci-enriched cell population surrounding the Purkinje cells. To this end, we combined FISH with the immunofluorescence against cell type-specific markers. NeuN is a widely used marker of mature neurons, but in the cerebellum it stains almost exclusively the granular neurons. Fox1 and Fox2 stain Purkinje and Golgi cells. In addition, Fox2 stains the granular cells neurons (Kim *et al.*, 2011). The analysis revealed that the majority of cells with the highest foci content in DMSXL mice and DM1 patients were NeuN-, Fox1- and Fox2-negative (Figure 3.A and 3.B), indicating that foci accumulate preferentially in non-neuronal cells of the cerebellum. The non-neuronal nature of the foci-enriched cell type was confirmed by the immunodetection of GFAP, a glial-specific cell marker in both DMSXL and adult DM1 cerebellum (Figure 3.A and 3.B).

Interestingly, and in contrast with adult DMSXL and DM1 patients, young DMSXL mice at post natal day eight (Supplementary Figure S1.A) and congenital DM1 patients at one month of age (Supplementary Figure S1.B) exhibited a wider distribution of RNA foci among different cell layers and cell types, with substantially higher foci accumulation in Purkinje cells. The highest foci content was nevertheless detected in a majority of NeuN-, Fox1- and Fox2-negative cells, surrounding the Purkinje neurons (Supplementary Figures S1.C and S1.D).



Our data reveal that DM1 mouse and human cerebellum accumulate abundant ribonuclear inclusions in the Bergmann glia cell population that surrounds the Purkinje cells, resulting in MBNL1 and MBNL2 sequestration. Bergmann glia is a population of astrocytes that contribute to synaptogenesis, synaptic transmission, and plasticity as well as to metabolite supply to neurons, osmoregulation and neuroprotection (Bellamy, 2006; Wang et al., 2012).

### **Expression of *DMPK* transcripts induces cell type-specific missplicing in cerebellum**

Following the accumulation of RNA foci accumulation and sequestration of MBNL proteins in the cerebellum, we investigated a possible splicing dysregulation in this brain region. We studied the splicing profiles of different candidate genes in one-month-old DMSXL homozygotes and adult DM1 cerebellum (Figure 4.A and 4.B). Splicing analysis revealed mild missplicing of a variety of alternative exons, such as *Mapt* exon 10, *Grin1* exon 21 and *App* exon 8. Missplicing events were also detected in human adult cerebellum (Figure 4.B), confirming that the CUG-induced spliceopathy is not a peculiarity of our mouse model, but a feature of DM1 cerebellum. Among the misregulated exons in the cerebellum, *LDB3* exon 11 is specifically misregulated in response to MBNL1 inactivation (Kalsotra et al., 2008), corroborating the deleterious impact of MBNL protein sequestration by RNA foci. *FXR1* exon 15 missplicing is the result of CELF1 upregulation, at least in heart (Kalsotra et al., 2008). Abnormal inclusion of *FXR1* exon 15 in both DM1 mice and human patients predicted upregulation of CELF proteins in the cerebellum, in response to the CTG expansion. To test this hypothesis, we quantified the steady-state levels of CELF1 and CELF2 in DMSXL and human DM1 cerebellum. Although CELF1 remained unchanged by the expression of toxic *DMPK* transcripts, CELF2 was significantly upregulated by ~40% in both DM1 mouse and human cerebellum (Figure 4.C, Supplementary Figure S2.A). To gain insight into the mechanisms of CELF2 upregulation, we analysed the profiles of CELF1 and CELF2 by bidimensional electrophoresis and found no changes in DMSXL cerebellum (Supplementary Figure S2.B), indicating these CELF proteins are not hyperphosphorylated in the cerebellum in response to the CTG repeat expansion (Supplementary Figure S2.B.). Using primary mouse brain cell cultures, we showed that only DMSXL astrocytes exhibit a marked upregulation of CELF1 and CELF2, relative to wild-type controls (Supplementary Figure S2.C), while primary DMSXL neurons expressed normal

CELF1 and CELF2 levels (Supplementary Figure S2.D). These data are consistent with the increased susceptibility to RNA toxicity of the glial cell lineage.

We were surprised by the mild spliceopathy of the DM1 cerebellum, given the severe foci accumulation in this region. Maybe the regional distribution of RNA foci between cell populations dictates cell type-specific spliceopathy: it is possible that the cells showing the highest foci content are more susceptible to RNA toxicity and develop the most pronounced spliceopathy. To test this hypothesis, we examined the splicing profiles of the foci-rich Bergmann population. Using laser capture microdissection (LCM), we captured Bergmann astrocytes and Purkinje cells in wild-type and DMSXL cerebellum. We then studied the alternative splicing of two robust splicing defects consistently detected in DM1 mouse and human cerebellum. Consistent with our hypothesis, *Mbnl2* splicing was specifically deregulated in foci-rich Bergmann glia, relative to Purkinje neurons. Although not significantly deregulated, *Mbnl1* also showed a tendency towards abnormal splicing in the same cell glial population (Figure 4.D).

### **Glutamate pathway dysregulation could alter the Purkinje cell activity**

To identify disease intermediates affected by the DM1 expansion that could explain the cerebellum-dependent behavioural and electrophysiological abnormalities, we performed a quantitative global proteomics analysis in DMSXL cerebellum. Among the proteins abnormally expressed in response to the CTG repeat expansion, we concentrated on the excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2), also named solute carrier family 1 member 2 (SLC1A2) or glial high affinity glutamate transporter (GLT1)]. EAAT2 plays an important function in the metabolism of the glutamate, one of the most important neurotransmitter in the CNS. EAAT2 is a glial glutamate transporter that ensures glutamate re-uptake from the intersynaptic space, avoiding neuroexcitotoxicity of postsynaptic neurons (Kanai and Hediger, 2004; O'Shea, 2002). Western-blot quantification confirmed decreased EAAT2 expression in the cerebellum of DMSXL mice (Figure 5.A and Supplementary Figure S3.A). To assess the extent of EAAT2 downregulation, we studied additional mouse brain regions, and found significantly decreased protein expression in brainstem, and a tendency to downregulation in the frontal cortex (Figure 5.A and Supplementary Figure S3.A). Severely reduced EAAT2 steady-state levels were validated in human DM1 brainstem and a marked tendency was found in the frontal cortex, relative to non-DM controls. In the cerebellum, 5 out of the 9

DM1 patients exhibited dramatically low EAAT2 protein expression (Figure 5.A and Supplementary Figure S3.A).

EAAT2 downregulation is associated with increased extracellular glutamate levels, synaptic excitability, neurotoxicity, neuronal dysfunction and possible neuronal cell death (Herman and Jahr, 2007; Kanai and Hediger, 2004; O'Shea, 2002; Tanaka et al., 1997). We have therefore looked for histopathological signs of neurodegeneration in the DMSXL cerebellum, but found no obvious changes in cellular density or morphology, relative to wild-type controls (Supplementary Figure S3.B). In addition, TUNNEL assays did not reveal signs of apoptosis in DMSXL cerebellum (data not shown). Since polyglutamine homopolymers can accumulate in DM1 muscle, as a result of non-canonical RAN translation of the CAG-containing anti-sense transcript (Zu et al., 2011), we tested whether the same toxic peptides accumulated in DMSXL cerebellum, but found no polyglutamine aggregates or ubiquitin-positive inclusions (Supplementary Figure S3.B). EAAT2 expression abnormalities in DMSXL cerebellum do not appear to be associated with overt signs of neurodegeneration or proteotoxicity, which could mediate cerebellar dysfunction. Instead EAAT2 downregulation may impair cerebellar physiology through cell dysfunction, rather than cell death, leading to the behavioural and electrophysiological phenotypes reported in DMSXL mice.

### **EAAT2/GLT1 downregulation is associated with PKC activation**

To gain insight of the mechanisms underlying EAAT2 deregulation, we first tested whether EAAT2 downregulation was the direct result of the expression of toxic CUG-containing transcripts, or a secondary consequence to integral brain dysfunction. To this end, we have quantified EAAT2 steady-state levels in cultured glial cells expressing CTG repeat expansions. EAAT2 is not naturally expressed by cultured astrocytes. To overcome this difficulty we have used a C6 glioma cell line that stably expresses EAAT2 (Kalandadze et al., 2002). The transfection of the EAAT2-expressing C6 glioma cells with expanded *DMPK* constructs, resulted in EAAT2 downregulation, relative to control cells transfected with no CTG constructs (Figure 5.B). These results confirmed that EAAT2 protein downregulation is a direct consequence of CUG RNA toxicity. The analysis of complementary mouse models of DM1, inactivated for *Mbnl1* or *Mbnl2*, revealed that MBNL loss of function is not sufficient to lower the expression of EAAT2 (Supplementary Figure S3.C)

The quantified *Eaat2* mRNA levels in DMSXL cerebellum by quantitative real-time PCR (Figure 5.C) showed no significant differences between wild-type and

DMSXL mice, indicating that EAAT2 deregulation in DM1 occurs post-translationally. Interestingly, PKC phosphorylation decreases the membrane expression of EAAT2, through an internalization process associated with ubiquitination (Kalandadze *et al.*, 2002). Since PKC $\alpha/\beta$  is phosphorylated and activated in the heart of DM1 mouse models and patients (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007), we tested whether PKC $\alpha/\beta$  activation occurs in the CNS, where it may disrupt EAAT2 expression. Western blot analysis revealed significant PKC $\alpha/\beta$  hyperphosphorylation in DMSXL cerebellum (Figure 5.D), arguing in favour of EAAT2 protein dysregulation through a PKC-mediated pathway.

## DISCUSSION

The molecular bases of the neurological manifestations of DM1 are not fully understood. It was our goal to investigate the involvement of different brain regions, cell types and molecular pathways in DM1 neuropathology. Our data revealed the implication of a previously unsuspected brain region: the cerebellum. This conclusion is supported by the cerebellum-dependent behavior abnormalities and the electrophysiological deficits of Purkinje cells detected in DMSXL transgenic mice, in association with typical signs of RNA toxicity and abnormal expression of the EAAT2/GLT1 glutamate transporter in a specific glial cell population.

### **DMSXL behavior and electrophysiology deficits demonstrate cerebellum dysfunction**

During the phenotypic description of our DM1 mouse model, DMSXL mice showed impaired cerebellum-dependent motor coordination, performing poorly in the runway test, which is frequently used to evaluate motor coordination in mouse models of cerebellar disease (Hanchar *et al.*, 2005). Although DMSXL mice exhibit reduced body weight and muscular deficits (Huguet *et al.*, 2012), these phenotypes should have minimal impact on their performance in the runway test. In fact, the smaller size and lighter body mass of DMSXL mice may facilitate their progress along an elevated runway. Since there are limited behavioural tasks to assess mouse cerebellar function independently, we performed electrophysiological recordings of cerebellar activity in DMSXL mice. The *in vivo* analysis of the spontaneous firing rate and rhythmicity constitutes an efficient way of assessing the functional states of the cerebellar neuronal network. Spontaneous simple spike firing reflects the integrated intrinsic excitability of Purkinje cells, resulting from the combined inhibition by the molecular interneurons, and excitation by the parallel and climbing fibers (Sato *et al.*, 1992; Schwarz and Welsh, 2001). The increased simple spike firing rate and rhythmicity in DMSXL cerebellum suggests hyperexcitability in response to the DM1 mutation (Cheron *et al.*, 2008; Servais and Cheron, 2005). Subsequent *in vitro* electrophysiological profiling revealed increased frequency of the spontaneous activity in Purkinje cells recorded in the cell attached configuration in acute cerebellar slices of DMSXL mice. DMSXL Purkinje cells also displayed reduced action potential afterhyperpolarization recovery time constant ( $\tau_{AHP}$ ), as well as a decreased threshold current. Taken together, these results strongly suggest cerebellar dysfunction in DMSXL mice, resulting from the hyperexcitability of the Purkinje cells, which could lead to the cerebellum-dependant behavioral abnormalities observed.

### **Signs of RNA toxicity in cerebellum**

To gain insight into the mechanisms behind cerebellum dysfunction, we first looked for signs of RNA toxicity in the DMSXL and DM1 patients cerebellum, that could lead to cell dysfunction. Consistent with a *trans* effect of toxic CUG RNA repeats in the cerebellum, we found RNA foci accumulation and missplicing events in DMSXL and DM1 cerebellum. The analysis of alternative splicing of *Mbnl1* exon 7 and *Ldb3* exon 11, known to be exclusively regulated by MBNL1 (Kalsotra et al., 2008) demonstrated the impact of functional inactivation of MBNL1 proteins in the cerebellum, following protein sequestration by RNA foci. *Fxr1* exons 15 and 16, regulated by CELF1, were also misspliced in DMSXL cerebellum (Kalsotra et al., 2008), however CELF1 steady-state levels remained unchanged in DMSXL and human DM1 cerebellum. In contrast, CELF2 was significantly upregulated, but the impact of this protein on the alternative splicing of *FXR1* is not known. It is possible that CELF1 and CELF2 share some functional overlapping, and that CELF2 upregulation in the cerebellum affects the inclusion ratio of *FXR1* exon 15. The mechanism of CELF2 upregulation in the CNS is poorly understood and our data indicate that it is unlikely mediated by hyperphosphorylation, as we previously reported in the frontal cortex and brainstem (Hernandez-Hernandez et al., 2013a). The analysis of CELF2-overexpressing mice would provide insight into the role of this protein DM1-associated cerebellum dysfunction.

Splicing defects were observed in both DMSXL and human cerebellum, illustrating the wide toxicity of CUG RNA repeats. Compared to frontal cortex or brainstem, splicing defects detected in whole DMSXL cerebellum were milder (Hernandez-Hernandez et al., 2013a). This does not mean that some limited cerebellar cell populations are not highly affected by toxic CUG transcripts, and that the effect is diluted in whole tissue samples.

### **Foci distribution in DM1 cerebellum is cell specific and more abundant in Bergman glia**

The highest foci content was detected in mouse and human Bergmann glia around Purkinje neurons, co-localising with MBNL1 and MBNL2, as in many other mouse and human tissues (Jiang et al., 2004; Miller et al., 2000 ). In contrast, a diffuse MBNL1 and MBNL2 signal was detected in the nucleus and cytoplasm of Purkinje cells from DMSXL mice and DM1 patients, even in those rare cells that accumulated foci. In other words, RNA foci accumulation does not seem to affect MBNL1 and MBNL2 localization in Purkinje cells. Our data corroborated previous results that showed that RNA foci in human DM1 Purkinje cells did not sequester MBNL1

(Daughters *et al.*, 2009). As a result MBNL proteins are likely functional in foci-positive Purkinje cells, hence explaining why MBNL1-dependent splicing events were not deregulated in laser microdissected DMSXL Purkinje neurons.

Little is known about *DMPK* and MBNL expression in Purkinje cells. It is conceivable that adult Purkinje cells express very low levels of *DMPK* transcripts, which are insufficient to trigger RNA toxicity in this cell type. Alternatively, adult Purkinje cells may express MBNL protein isoforms with reduced affinity to CUG repeats. Finally, Purkinje cells may express other proteins that compete with MBNL to bind CUG RNA repeats, thereby maintaining MBNL proteins soluble and functional in the cell.

The high foci content and severe splicing deregulation in Bergmann cells indicates greater susceptibility of this cell type to the toxic effects of CUG RNA repeats, and hints at glial dysfunction in the cerebellum. It is known that Bergmann astrocytes can modify synaptic plasticity of Purkinje cells (Bellamy, 2006; Wang *et al.*, 2012). Therefore, it is conceivable that CUG-induced Bergmann cell dysfunction in DM1 impairs Purkinje cell electrophysiology and function, even though the latter do not show abundant foci or splicing dysregulation.

### **Glutamate level dysregulation may contribute to cerebellar dysfunction**

EAAT2 expression was significantly decreased in DMSXL cerebellum and showed a marked tendency towards downregulation in human DM1 cerebellum. Decreased EAAT2 expression was observed in other brain regions of the DMSXL mice and DM1 patients, such as the frontal cortex and brainstem. EAAT2 downregulation is associated with PKC $\alpha/\beta$  activation by hyperphosphorylation, which is involved in the expression and stabilisation of the glutamate transporter at the cell surface (Garcia-Tardon *et al.*, 2012; Kalandadze *et al.*, 2002). PKC $\alpha/\beta$  is activated in other DM1 tissues, where it is responsible for CELF1 phosphorylation and stabilization (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007). However, activation of PKC $\alpha/\beta$  in the cerebellum is not associated with substantial CELF1 upregulation, but it is sufficient to affect other targets, such as EAAT2, reducing its steady-state levels, possibly in a cell type-specific manner. Nonetheless, it would be interesting to investigate whether CELF1 is specifically upregulated in limited cerebellar cell populations, such as the Bergmann glia.

EAAT2 is a glial glutamate transporter, expressed in multiple regions of the CNS. This transporter is responsible for the removal of the excitatory neurotransmitter glutamate from the synaptic cleft, thus playing a crucial role in protecting post-synaptic neurons against glutamate excitotoxicity, neurodysfunction and ultimately neurodegeneration (Herman and Jahr, 2007; Kanai and Hediger,



2004; O'Shea, 2002). Nevertheless, no signs of neurodegeneration were detected in DMSXL cerebellum, suggesting that, although insufficient to cause cell death, EAAT2 downregulation may increase the levels of extracellular glutamate, possibly, leading to neuronal dysfunction. The hypothesis of increased extracellular glutamate in DMSXL mice is corroborated by the increased CNS excitability, illustrated by their higher susceptibility to PTZ-induced seizures (Charizanis *et al.*, 2012). We are currently assessing glutamate uptake by cells expressing large CTG repeat expansions. Deficits in glutamate homeostasis in DM1 may induce CNS dysfunction and contribute to the behaviour and electrophysiological abnormalities of our transgenic mice, notably in the cerebellum.

### **The involvement of the cerebellum in the DM1 neuropathology**

The cerebellum is a complex brain region, traditionally implicated in motor coordination and balance. It is primarily involved in the coordination of skilled voluntary movements, as well as in the control of motor tone, posture and gait. Cerebellum dysfunction is usually associated with ataxia, lack of coordination or tremor. Although gait and coordination problems are not typical DM1 features, it remains possible that subtle sub-clinical motor manifestations, such as mild episodes of loss of balance and sudden falls, are masked by other, more prominent symptoms (*e.g.* muscle weakness and myotonia).

The cerebellum establishes connections with non-motor cortical and subcortical areas associated with emotional processing, including the limbic system and the prefrontal cortex (Strick *et al.*, 2009). As a result, cerebellum function is also linked to language (Chen and Desmond, 2005), anxiety (Sacchetti *et al.*, 2005), emotion (Parvizi *et al.*, 2001) and many others non-motor aspects of behaviour. The involvement of the cerebellum in DM1 neuropathology through its non-motor functions appears more likely. Indeed, cerebellar lesions have often exhibited a pattern of cognitive and behaviour abnormalities characterised by executive dysfunction, blunting or flattening of affect, constrictions in social interaction and impaired spatial cognition (Schmahmann, 1998; Schmahmann and Sherman, 1998). Interestingly, these abnormalities have all been reported in DM1 patients to a variable extent. Our results are in line with a mediating role of cerebellum dysfunction in the onset of some of these neuropsychological manifestations, through the impairment of Bergmann glia, glutamate transport and Bergmann/Purkinje cell communication. The involvement of EAAT2 and glutamate homeostasis in the mechanisms of DM1 in the cerebellum and in the CNS in general requires further investigation, notably through the rescue of EAAT2 expression in DMSXL mice through pharmacological approaches (Rothstein *et al.*, 2005) followed

by the behavioural assessment and electrophysiological profiling of treated mice. These experiments should not only elucidate the involvement of glutamate metabolism in the behavioural deficits of DMSXL mice, but also provide some insight into possible therapeutic strategies in the future.

Our data bring new insights into the DM1 mechanism in the brain, through different approaches. It also brings the cerebellum into the DM1 spotlight, a brain region that has been overlooked in this condition.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Behavioural and electrophysiological phenotyping revealed cerebellum dysfunction in DMSXL mice. (A)** Assessment of cerebellum-dependent motor-coordination of DMSXL homozygotes (n=19) and wild-type controls (n=21) in the runway test over five consecutive days. The graph represents the average number of hind leg slips per trial (four trials per day). The DMSXL line shows a significant increased number of hind leg slips, during five consecutive days, as well as three weeks later, following a test-free period ( $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ ). Learning was assessed by number of slips at day five, relative to day, and retention of the task was assessed at day 26 following a three-week period without testing (+++,  $p < 0.001$ ). **(B)** *In vivo* electrophysiological analysis of mouse cerebellum activity in alert DMSXL homozygous (n=4) and wild-type (n=3) mice at two months of age. DMSXL mice showed higher single spike (SS) frequency rate and higher rhythmicity (RI), compared to the wild-type controls ( $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ ). **(C)** Patch clamp electrophysiological recordings of Purkinje cells activity in DMSXL and wild-type cerebellum slices. A schematic representation of the typical shape and phases of action potentials (AP) in DMSXL and wild-type Purkinje cells is shown on the left. The graphs show the mean threshold current required to initiate an AP, the frequency of the spontaneous activity and the action potential afterhyperpolarization (AHP) recovery time constant ( $\tau_{AHP}$ ). DMSXL Purkinje cells exhibited statistically significant differences in all electrophysiological parameters studied, indicating dysfunctional Purkinje cells ( $*p < 0.05$ ).

**Figure 2. Distribution of nuclear RNA foci in DMSXL and human cerebellum. (A)** Calbindin immunodetection of Purkinje cells (PC) in adult mouse cerebellum (cell bodies labelled in green). This picture represents the three histological organization of the three cell layers of the cerebellum: the molecular (ML), granular (GC) and Purkinje cell (PC) layer. **(B-C)** *DMPK* RNA foci (red) were detected by FISH associated with fluorescent immunodetection of MBNL1 or MBNL2 (green) in **(B)** one-month-old DMSXL mice and **(C)** in adult DM1 human cerebellum. Foci always observed in cells closely located around Purkinje cells, but rarely in the Purkinje cell nucleus of adult DMSXL and DM1 cerebellum. Foci co-localise with MBNL proteins, except in Purkinje cells. No RNA foci were observed in DM20 and wild-type control animals (*data not shown*). The scale bar represents 10  $\mu\text{m}$ .

**Figure 3. Abundant RNA foci accumulation in cerebellar Bergmann glia cells.** FISH detected nuclear *DMPK* RNA foci (red), while immunodetection of NeuN, Fox1, Fox2 or GFAP (green) detected specific cell type markers **(A)** in one-month-old DMSXL mouse cerebellum, as well **(B)** as in adult DM1 human cerebellum. A higher frequency of foci was observed in non-neuronal cells in DMSXL and human cerebellum. No RNA foci were observed in DM20 and wild-type control animals (*data not shown*). PC: Purkinje cell; GL: granular layer. DAPI was used for nuclear staining. The scale bar represents 10  $\mu$ m.

**Figure 4. Expression of DMPK transcripts induces missplicing DMSXL as well as CELF2 upregulation and DM1 cerebellum.** Splicing profiles of different mRNA transcripts were compared in cerebellum of **(A)** non-transgenic controls mice (n=4) and DMSXL (n=4) at one month of age and **(B)** human controls (n=5) and DM1 patients (n=9) by RT-PCR analysis. Ratio of inclusion of alternative exons was determined in mRNA transcripts encoding: MBNL1 and MBNL2 splicing regulators, microtubule-associated protein tau (MAPT/TAU), GRIN1/NMDAR1 glutamate receptor, amyloid beta precursor protein (APP), FXR1 RNA binding protein and LDB3 cytoskeleton-interacting protein. Mild missplicing of mRNA was detected in DMSXL and in human DM1 cerebellum. **(C)** Western-blot quantification of CELF1 and CELF2 expression levels in DMSXL and wild-type mice (n=4, each genotype) at one month of age; and in adult control DM1 patients (n=8) and non-DM individuals (n=3) CELF2 upregulation in DMSXL and DM1 patients is statistically significant. **(D)** Representative PCR products and quantification of *Mbnl1* and *Mbnl2* alternative exon inclusion in Purkinje cells and in neighbouring Bergmann glia collected by laser microdissection DMSXL and wild-type mice (n=3, each genotype) at one month of age. Three independent replicates were performed for each mouse. *Mbnl2* splicing was significantly deregulated in DMSXL Bergmann glia (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

**Figure 5. EAAT2 downregulation in DMSXL cerebellum.** **(A)** Quantification of EAAT2 expression levels in cerebellum, brainstem and frontal cortex of one-month-old DMSXL and wild-type mice (n=4, each genotype; left graph); as well as DM1 patients (n=7-9) compared to non-DM controls. EAAT2 expression was significantly decreased in DMSXL cerebellum and brainstem, as well as in DM1 brainstem. Severely reduced EAAT2 steady state levels were detected in 5 out of the 9 DM1 cerebella. A marked tendency towards lower protein levels was found in DM1 frontal cortex. **(B)** EAAT2 downregulation was observed upon (CTG)<sub>960</sub> expansions

transfection (DT960) of C6 glioma cell line, versus control transfection with no repeats (DMPKS) and non transfected cells. **(C)** Quantification of *Eaat2* mRNA levels by quantitative real-time PCR did not show transcript level differences between DMSXL homozygous and wild-type controls (n=4, each genotype) **(D)** Western blot analysis of PKC $\alpha/\beta$  and phosphor-PKC $\alpha/\beta$  (p-PKC $\alpha/\beta$ ) expression levels in DMSXL and wild-type cerebellum (n=4, each genotype). PKC $\alpha/\beta$  is significantly phosphorylated in show DMSXL cerebellum (\* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.001).

**REFERENCES**

- Angeard, N., et al., 2007. Cognitive profile in childhood myotonic dystrophy type 1: is there a global impairment? *Neuromuscul Disord.* 17, 451-8.
- Angeard, N., et al., 2011. A new window on neurocognitive dysfunction in the childhood form of myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Neuromuscul Disord.* 21, 468-76.
- Ashizawa, T., Sarkar, P.S., 2011. Myotonic dystrophy types 1 and 2. *Handb Clin Neurol.* 101, 193-237.
- Bellamy, T.C., 2006. Interactions between Purkinje neurones and Bergmann glia. *Cerebellum.* 5, 116-26.
- Brook, J.D., 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, 385.
- Chang, L., et al., 1993. Cerebral abnormalities in myotonic dystrophy. Cerebral blood flow, magnetic resonance imaging, and neuropsychological tests. *Arch Neurol.* 50, 917-23.
- Charizanis, K., et al., 2012. Muscleblind-like 2-Mediated Alternative Splicing in the Developing Brain and Dysregulation in Myotonic Dystrophy. *Neuron.* 75, 437-50.
- Charlet, B.N., et al., 2002. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell.* 10, 45-53.
- Chen, S.H., Desmond, J.E., 2005. Temporal dynamics of cerebro-cerebellar network recruitment during a cognitive task. *Neuropsychologia.* 43, 1227-37.
- Cheron, G., et al., 2004. Inactivation of calcium-binding protein genes induces 160 Hz oscillations in the cerebellar cortex of alert mice. *J Neurosci.* 24, 434-41.
- Cheron, G., Servais, L., Dan, B., 2008. Cerebellar network plasticity: from genes to fast oscillation. *Neuroscience.* 153, 1-19.
- Daughters, R.S., et al., 2009. RNA gain-of-function in spinocerebellar ataxia type 8. *PLoS Genet.* 5, e1000600.
- de Leon, M.B., Cisneros, B., 2008. Myotonic dystrophy 1 in the nervous system: from the clinic to molecular mechanisms. *J Neurosci Res.* 86, 18-26.
- Fugier, C., et al., 2011. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med.* 17, 720-5.
- Gagnon, C., et al., 2010. Health supervision and anticipatory guidance in adult myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord.* 20, 847-51.

- Garcia-Tardon, N., et al., 2012. Protein kinase C (PKC)-promoted endocytosis of glutamate transporter GLT-1 requires ubiquitin ligase Nedd4-2-dependent ubiquitination but not phosphorylation. *J Biol Chem.* 287, 19177-87.
- Gomes-Pereira, M., et al., 2007. CTG trinucleotide repeat "big jumps": large expansions, small mice. *PLoS Genet.* 3, e52.
- Hanchar, H.J., et al., 2005. Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA(A) receptor activity. *Nat Neurosci.* 8, 339-45.
- Harper, P.S., 2001. *Myotonic Dystrophy*, Vol., WB Saunders.
- Herman, M.A., Jahr, C.E., 2007. Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *J Neurosci.* 27, 9736-41.
- Hernandez-Hernandez, O., et al., 2013a. Myotonic dystrophy CTG expansion affects synaptic vesicle proteins, neurotransmission and mouse behaviour. *Brain.* 136, 957-70.
- Hernandez-Hernandez, O., et al., 2013b. Synaptic protein dysregulation in myotonic dystrophy type 1: disease neuropathogenesis beyond missplicing. *Rare diseases (in press)*.
- Huguet, A., et al., 2012. Molecular, physiological, and motor performance defects in DMSXL mice carrying >1,000 CTG repeats from the human DM1 locus. *PLoS Genet.* 8, e1003043.
- Jiang, H., 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, 3079-88.
- Kalandadze, A., Wu, Y., Robinson, M.B., 2002. Protein kinase C activation decreases cell surface expression of the GLT-1 subtype of glutamate transporter. Requirement of a carboxyl-terminal domain and partial dependence on serine 486. *J Biol Chem.* 277, 45741-50.
- Kalsotra, A., 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, 20333-8.
- Kanai, Y., Hediger, M.A., 2004. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch.* 447, 469-79.
- Kim, K.K., et al., 2011. Fox-3 and PSF interact to activate neural cell-specific alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 39, 3064-78.
- Kuyumcu-Martinez, N.M., Wang, G.S., 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.
- Laberge, L., et al., 2007. The correlation of CTG repeat length with material and social deprivation in myotonic dystrophy. *Clin Genet.* 71, 59-66.
- Mankodi, A., et al., 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.

- Meola, G., et al., 1999. Reduced cerebral blood flow and impaired visual-spatial function in proximal myotonic myopathy. *Neurology*. 53, 1042-50.
- Meola, G., et al., 2003. Executive dysfunction and avoidant personality trait in myotonic dystrophy type 1 (DM-1) and in proximal myotonic myopathy (PROMM/DM-2). *Neuromuscul Disord*. 13, 813-21.
- Meola, G., Sansone, V., 2007. Cerebral involvement in myotonic dystrophies. *Muscle Nerve*. 36, 294-306.
- Miller, J.W., et al., 2000. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *Embo J*. 19, 4439-48.
- Minnerop, M., et al., 2011. The brain in myotonic dystrophy 1 and 2: evidence for a predominant white matter disease. *Brain*.
- O'Shea, R.D., 2002. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 29, 1018-23.
- Parvizi, J., et al., 2001. Pathological laughter and crying: a link to the cerebellum. *Brain*. 124, 1708-19.
- Peixoto, A., et al., 2004. Quantification of multiple gene expression in individual cells. *Genome Res*. 14, 1938-47.
- Ranum, L.P., Cooper, T.A., 2006. RNA-Mediated Neuromuscular Disorders. *Annu Rev Neurosci*. 29, 259-277.
- Romeo, V., et al., 2010. Brain involvement in myotonic dystrophies: neuroimaging and neuropsychological comparative study in DM1 and DM2. *J Neurol*.
- Rothstein, J.D., et al., 2005. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*. 433, 73-7.
- Sacchetti, B., Scelfo, B., Strata, P., 2005. The cerebellum: synaptic changes and fear conditioning. *Neuroscientist*. 11, 217-27.
- Sansone, V., et al., 2007. Cognitive impairment in adult myotonic dystrophies: a longitudinal study. *Neurol Sci*. 28, 9-15.
- Sato, Y., et al., 1992. Short-term modulation of cerebellar Purkinje cell activity after spontaneous climbing fiber input. *J Neurophysiol*. 68, 2051-62.
- Schmahmann, J.D., 1998. Dysmetria of thought: clinical consequences of cerebellar dysfunction on cognition and affect. *Trends in Cognitive Sciences*. 2, 362-371.
- Schmahmann, J.D., Sherman, J.C., 1998. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain*. 121 ( Pt 4), 561-79.
- Schwarz, C., Welsh, J.P., 2001. Dynamic modulation of mossy fiber system throughput by inferior olive synchrony: a multielectrode study of cerebellar cortex activated by motor cortex. *J Neurophysiol*. 86, 2489-504.
- Servais, L., et al., 2005. Effect of chronic ethanol ingestion on Purkinje and Golgi cell firing in vivo and on motor coordination in mice. *Brain Res*. 1055, 171-9.



- Servais, L., Cheron, G., 2005. Purkinje cell rhythmicity and synchronicity during modulation of fast cerebellar oscillation. *Neuroscience*. 134, 1247-59.
- Seznec, H., et al., 2000. Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability. *Hum Mol Genet*. 9, 1185-1194.
- Sicot, G., Gourdon, G., Gomes-Pereira, M., 2011. Myotonic dystrophy, when simple repeats reveal complex pathogenic entities: new findings and future challenges. *Hum Mol Genet*. 20, R116-23.
- Sicot, G., Gomes-Pereira, M., 2013. RNA toxicity in human disease and animal models: From the uncovering of a new mechanism to the development of promising therapies. *Biochim Biophys Acta*.
- Sistiaga, A., et al., 2009. Cognitive/personality pattern and triplet expansion size in adult myotonic dystrophy type 1 (DM1): CTG repeats, cognition and personality in DM1. *Psychol Med*. 1-9.
- Steyaert, J., et al., 1997. A study of the cognitive and psychological profile in 16 children with congenital or juvenile myotonic dystrophy. *Clin Genet*. 52, 135-41.
- Steyaert, J., et al., 2000. Behavioral phenotype in childhood type of dystrophia myotonica. *Am J Med Genet*. 96, 888-9.
- Strick, P.L., Dum, R.P., Fiez, J.A., 2009. Cerebellum and nonmotor function. *Annu Rev Neurosci*. 32, 413-34.
- Sugihara, I., Lang, E.J., Llinas, R., 1995. Serotonin modulation of inferior olivary oscillations and synchronicity: a multiple-electrode study in the rat cerebellum. *Eur J Neurosci*. 7, 521-34.
- Tanaka, K., et al., 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*. 276, 1699-702.
- Wang, F., et al., 2012. Bergmann glia modulate cerebellar Purkinje cell bistability via Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109, 7911-6.
- Winblad, S., Lindberg, C., Hansen, S., 2006. Cognitive deficits and CTG repeat expansion size in classical myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Behav Brain Funct*. 2, 16.
- Zu, T., et al., 2011. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108, 260-5.

## Supplemental Information

### **The molecular, electrophysiological and behavioural deficits in the cerebellum of a mouse model of myotonic dystrophy type I point to cell type-specific sensitivity to RNA toxicity**

Géraldine Sicot<sup>1,2</sup>, Cynthia Prigogine<sup>3</sup>, David Gall<sup>3</sup>, Fadia Medja<sup>1,2</sup>, Cerina Chuon<sup>4</sup> Aline Huguet<sup>1,2</sup>, Annie Nicole<sup>1,2</sup>, Arnold Munnich<sup>1</sup>, Chiara Guerrera<sup>4</sup>, Guy Cheron<sup>3</sup>, Laurent Servais<sup>3,5</sup>, Geneviève Gourdon<sup>1,2</sup>, Mário Gomes-Pereira<sup>1,2,6</sup>

#### **Supplementary materials and methods.**

**Supplementary table 1.** Primary antibodies used for protein immunodetection in western blot analysis and immunofluorescence.

**Supplementary table 2.** Oligonucleotide primers sequences for mouse RT-PCR analysis.

**Supplementary Table 3.** Oligonucleotide primers sequences for human RT-PCR analysis.

**Supplementary Table 4.** Oligonucleotide primers sequences for RT-PCR analysis of lasermicrodissected mouse cells.

#### **Supplementary figure legends.**

**Figure S1.** Distribution of nuclear RNA foci in young DMSXL and congenital human cerebellum.

**Figure S2.** DMSXL cerebellum does not show hyper acidic isoform of CELF proteins.

**Figure S3.** Downregulation of EAAT2 in DMSXL and human DM1 brain regions does not lead to neurodegeneration and is not mediated by MBNL loss of function.

## SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

### iTraq analysis

*iTraq labelling.* Protein iTRAQ labeling was performed according to the manufacturer's instructions (iTRAQ 4plex kit, ABSCIEX). Briefly, protein pellets (100µg) were suspended in 20µL of 500mM triethylammonium bicarbonate (TEAB) and 1µL of 2% SDS, they were then reduced with 2µL 50mM tris-(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) for 1h at 60°C and finally alkylated with 1µL of 200mM methyl methanethiosulfonate (MMTS) for 10min at room temperature. Proteins were digested with 2 µg of sequencing grade modified trypsin (Promega) for 16h at 37°C. The resulted peptides were labeled with iTRAQ reagents and quenched with Milli-Q water. The labeled samples were mixed in a 1:1:1:1 ratio and stored at -20°C.

*Sample clean-up by SCX & Sep-Pak.* An aliquot of the iTRAQ 4-plex-labeled peptide mixture (100µg) was cleaned up with a cation-exchange cartridge SCX (from ICAT Reagent Kit, ABSCIEX), equilibrated with 10mM potassium phosphate, pH 3, 25% acetonitrile. Peptides were eluted with 500µL of 350mM potassium chloride, 25% acetonitrile and concentrated in a centrifugal evaporator, under vacuum. The sample was reconstituted in 0.1% trifluoroacetic acid and loaded on a Sep-Pak cartridge (Waters) for desalting. After washing, the peptides were eluted in 1mL of 70% acetonitrile- 0.1% trifluoroacetic acid and dried in a vacuum concentrator.

*MS/MS Analysis.* Nano-LC-MS/MS analysis was performed on an Ultimate 3,000 Rapid Separation Liquid Chromatography (RSLC) system (Dionex) coupled to LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific). Dried peptides were resuspended in 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid, 10% acetonitrile, and pre-concentrated on a 75 µm i.d. reversed-phase (RP) trapping column and separated with an aqueous-organic gradient (solution "A": 0.1% formic acid in 5% acetonitrile; solution "B": 0.085% formic acid in 80% (acetonitrile; flow rate 400 nl/min) on a 75 µm RP column (Acclaim PepMap RSLC 75 µm x 15 cm, 2 µm, 100Å, Dionex). Samples were eluted using a linear gradient from 5% to 40% solvent B in 190 min. One FTMS full scan was performed (resolution 60,000; positive polarity; centroid data; scan range 400 to 2,000 m/z) and the 10 most intense signals were subjected to MS/MS fragmentation both in the collision-induced dissociation (CID) cell and high-energy collision dissociation (HCD) cell for the same precursor ion. CID fragmentation was performed with a target value of 5000, collision energy of 35 V, Q value of 0.25 and activation time of 10 ms while HCD was done using a target value of 50000, collision energy of 50 V and activation time of 0.1 ms. LC-MS/MS data were transferred to the Proteome Discoverer software v1.2 to create the .mgf file, which was searched against the *Mus musculus* subset (16547 sequences) of the UniprotKB/Swissprot database (release 2012\_06; 536796 sequences) using the Mascot

search engine (version 2.2.07; Matrix Science) for protein identification and protein quantification. Fixed modification (iTRAQ 4plex (K) and N-terminus) and variable modification (Methylthio (C), Oxidation (M)) were allowed as well as one missed cleavage. Monoisotopic peptide mass tolerance was  $\pm 5$  ppm (after linear recalibration), and fragment mass tolerance was  $\pm 0.5$  Da. Filters for protein quantification were set as follow: protein ratio type was "weighted", normalization was done with summed intensities and outliers were removed automatically. Only proteins quantified with at least 2 peptides and with the ion score higher than 25 were retained. False discovery rate was less than 2%.

**Supplementary Table 1. Primary antibodies used for protein immunodetection in western blot analysis and immunofluorescence.**

Antigene	Supplier, reference	Application	Page (%)	Species origin	Incubation dilutions	Ab dilution
Actin	BD laboratories ; 612656	WB	10-12	mouse	5% blotto, 1H, RT	1/5000
CELF1	Upstate ; 05-621	WB	10	mouse	5% blotto, 1H, RT	1/1000
CELF2	Sigma ; C9367	WB	10	mouse	5% blotto, 2H, RT	1/1000
EAAT2	Ozyme ; #3838	WB	10	rabbit	5% blotto, 1H, RT	1/1000
PKC $\alpha/\beta$	BD transduction ; 610107	WB	10	mouse	5% blotto, 1H, RT	1/1000
p-PKC $\alpha/\beta$	Cell signaling ; 9375S	WB	10	mouse	5% blotto, 1H, RT	1/1000
MBNL1	MB1A from Glen Morris (gift)	IF	N/A	mouse	0,1% BSA, 10% NGS, 1H, RT	1/10
MBNL2	MB2A from Glen Morris (gift)	IF	N/A	mouse	0,1% BSA, 10% NGS, 1H, RT	1/10
FOX1	Abcam; ab83574	IF	N/A	mouse	10% NGS, 1H, RT	1/400
FOX2	Abcam; ab57154	IF	N/A	mouse	10% NGS, 1H, RT	1/400
NeuN	Chemicon ; MAB377	IF	N/A	mouse	10% NGS, 1H, RT	1/400
GFAP	DakoCytomation ; Z0334	IF	N/A	rabbit	10% NGS, 1H, RT	1/400
Calbindin	Swant ; CB38	IF	N/A	mouse	10% NGS, 1H, RT	1/1000

BSA, bovine serum albumin; IF, immunofluorescence; N/A, not applicable; NGS, normal-goat serum; RT, room temperature; WB, western blot.

**Supplementary Table 2. Oligonucleotide primers sequences for mouse RT-PCR analysis.**

Gene	Exon	Forward primer	Reverse primer	PCR product size(bp)
<b><i>Mbn1</i></b>	<b>7</b>	TGGTGGGAGAAATGCTGTATGC	GCTGCCCAATACCAGGTCAAC	270/216
<b><i>Mbn2</i></b>	<b>7</b>	CTTTGGTAAGGGATGAAGAGCAC	ACCGTAACCGTTTGTATGGATTAC	255/201
<b><i>Mapt/Tau</i></b>	<b>10</b>	CTGAAGCACCAGCCAGGAGG	TGGTCTGTCTTGGCTTTGGC	367/274
<b><i>Grin1/Nmdar1</i></b>	<b>5</b>	AGCGTCGTCCTCGCTTGCAGAA	GACAAGAGCATCCACCTGAGCT	360/297
<b><i>Grin1/Nmdar1</i></b>	<b>21</b>	GCAGCTGGCCCTCCTCCCTCTC	ATGCCCTGCCACCCTCACTTTT	381/270
<b><i>Ldb3</i></b>	<b>8</b>	TGCTGACAGTGGTAGTGCTCTTTC	GGAAGATGAGGCTGATGAGTGG	760/575
<b><i>Fxr1</i></b>	<b>15</b>	GATAATACAGAATCCGATCAG	CTGAAGGACCATGCTCTTCAATCAC	370/289/194
<b><i>App</i></b>	<b>11</b>	ACCGAGAGAACAACCAGCAC	GTCTCTCATTGGCTGCTTCC	556/499/331
<b><i>Eaat2</i></b>	<b>N/A</b>	CCATCATTGCCGCGTGC	TGACCGCCTTGGTGGTATTGG	249
<b><i>Tbp1</i></b>	<b>N/A</b>	GGTGTGCACAGGAGCCAAGAGTG	AGCTACTGAACTGCTGGTGGGTC	192
<b><i>Gapdh</i></b>	<b>N/A</b>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	123
<b><i>18S</i></b>	<b>N/A</b>	CAGTGAAACTGCCAATGG	CGGGTTGGTTTTGATCTG	165

N/A, not applicable.

**Supplementary Table 3. Oligonucleotide primers sequences for human RT-PCR analysis.**

Gene	Exon	Forward primer	Reverse primer	PCR product size(bp)
<b><i>MBNL1</i></b>	<b>7</b>	GCTGCCCAATACCAGGTCAAC	TGGTGGGAGAAATGCTGTATGC	216/162
<b><i>MBNL2</i></b>	<b>7</b>	ACAAGTGACAACACCGTAACCG	TTTGGTAAAGGATGAAGAGCACC	212/158
<b><i>MAPT/TAU</i></b>	<b>10</b>	CAACGCCACCAGGATTCCAGCAAA	ATGTTGCCTAATGAGCCACACTTG	486/393
<b><i>GRIN1/NMDAR1</i></b>	<b>5</b>	CAGTCCAGCGTGTGGTTTGAGATG	TGGCAGAAAGGATGATGACCCG	295/232
<b><i>GRIN1/NMDAR1</i></b>	<b>21</b>	CGTGTGGCGGAAGAACCTG	CTGTCTGCGGGGGAGGGG	292/181
<b><i>LDB3</i></b>	<b>8</b>	GATGAGGCTGACGAGTGGGCAC	ACTGCGGGGCTGTAGGAAGAGG	344/155
<b><i>FXR1</i></b>	<b>15/16</b>	GCTGTTCTGATGGATGGAATG	AGGACTGCTGCTTCTTGAGTG	216/297/ 308/389
<b><i>APP</i></b>	<b>8</b>	CCACAGAGAGAACCACCAGCATTGC	GATACTTGTCACGGCATCAGGGG	285/117
<b><i>β-Actin</i></b>	<b>N/A</b>	CCGTCTTCCCCTCCATCG	CCTCGTCGCCACATAGG	87
<b><i>GAPDH</i></b>	<b>N/A</b>	AGTCCATGCCATCACTGCCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTAG	447

N/A, not applicable.

**Supplementary Table 4. Oligonucleotide primers sequences for RT-PCR analysis of lasermicrodissected mouse cells.**

Gene	Exon	Primer 1	Primer 2	Primer 3	PCR product size(bp)
<b><i>Mbnl1</i></b>	<b>7</b>	CAATGTTGGTCACGGGGAATC	GCTGCCCAATACCAGGTCAAC	TGGTGGGAGAAATGCTGTATGC	270/216
<b><i>Mbnl2</i></b>	<b>7</b>	CCATAGGGACAAATGCGG	ACCGTAACCGTTTGTATGGATTAC	TTGGTAAGGGATGAAGAGC	255/201
<b><i>Tbp1</i></b>	<b>N/A</b>	CGTGAATCTTGGCTGTAAC	GGTGTGCACAGGAGCCAAGAG	CTGAACTGCTGGTGGGTC	486/192
<b><i>Gapdh</i></b>	<b>N/A</b>	ACGGACACATTGGGGTAGG	GCCCTTCCACAATGCCAAAG	CATCACCATCTTCCAGGAGCG	302

N/A, not applicable.

## SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

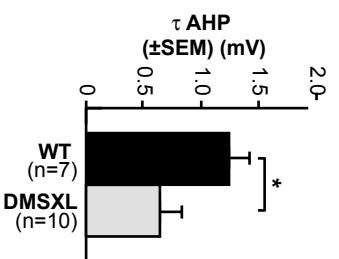
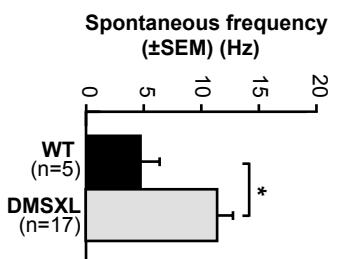
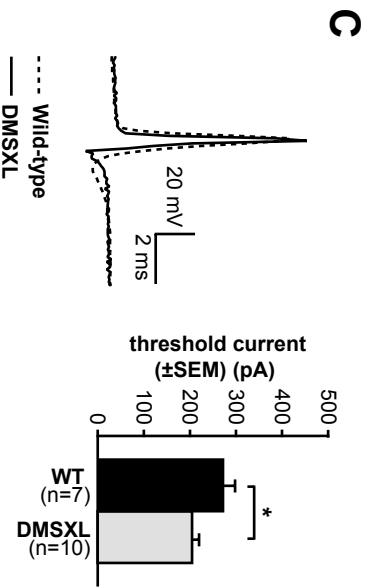
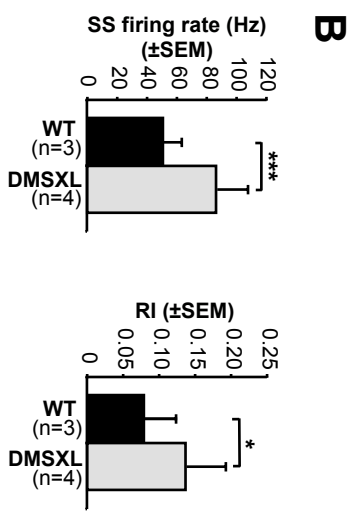
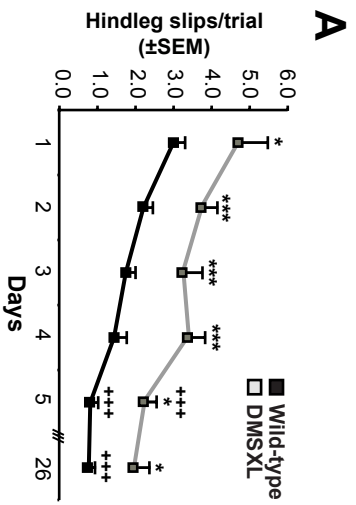
**Figure S1. Distribution of nuclear RNA foci in young DMSXL and congenital human cerebellum.** *DMPK* RNA foci (red) were detected by FISH. MBNL1 and MBNL2 were detected by immunofluorescence (green) in **(A)** eight days postnatal DMSXL mice and **(B)** in congenital DM1 cerebellum. Foci were consistently observed in cells close to Purkinje cells (PC), where they co-localised with MBNL proteins. Foci in Purkinje cells of young DMSXL and congenital DM1 cerebellum did not co-localise with MBNL proteins. **(C-D)** FISH detected nuclear *DMPK* RNA foci (red). NeuN, Fox1, Fox2 or GFAP were detected by immunofluorescence (green) **(C)** in eight days postnatal DMSXL mouse cerebellum, as well as in **(D)** congenital human DM1 cerebellum. A higher frequency of RNA foci was observed in non-neuronal cells in young DMSXL and human congenital DM1 cerebellum. PC: Purkinje cell, GL: granular layer. DAPI was used for nuclear staining. The scale bar represents 10  $\mu\text{m}$ .

**Figure S2. DMSXL cerebellum does not show hyper acidic isoform of CELF proteins.** **(A)** Western blot analysis of CELF1 and CELF2 expression in DMSXL and wild-type cerebellum (n=4, each genotype) at one month of age (top panel), and in DM1 (n=8) and non-DM cerebella (n=4) (bottom panel).  $\beta$ -Actin was used as internal control. **(B)** Bidimensional electrophoresis and CELF immunodetection was performed on a protein pool of DMSXL homozygous cerebellum (n=3) versus a protein extract of wild-type controls (n=3). No hyperacidic isoforms were detected in DMSXL cerebellum. **(C-D)** Western blot quantification of CELF1 and CELF2 protein levels in DMSXL homozygotes, DMSXL hemizygotes and wild-type primary **(C)** astrocytes (n=3, each genotype) and **(D)** neurons (n=3, each genotype). CELF1 and CELF2 were significantly upregulated in DMSXL primary DMSXL astrocytes, but unaltered in primary DMSXL neurons. CELF2 expression was not detected in neuronal cultures.  $\beta$ -Actin was used as internal control (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

**Figure S3. Downregulation of EAAT2 in DMSXL and human DM1 brain regions does not lead to neurodegeneration and is not mediated by MBNL loss of function.** **(A)** Representative western-blot analyses of EAAT2 expression in adult DMSXL mice and DM1 patients. **(B)** Histopathological changes in DMSXL cerebellum were studied by hematoxylin-eosin and cresyl violet staining. Proteotoxicity was investigated by polyglutamine and ubiquitin immunodetection. No signs of cells neurodegeneration were observed. SCA8 and FXTAS mouse brains were used as positive controls for

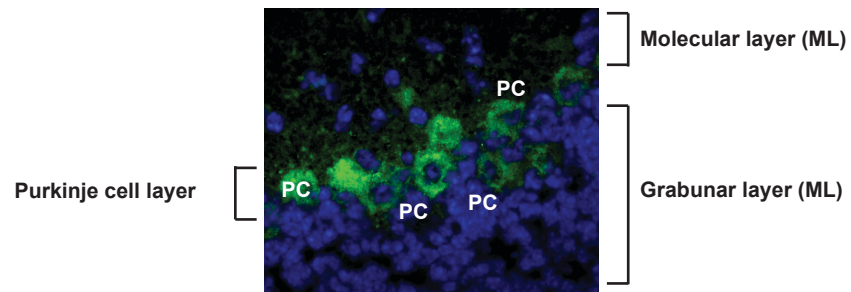
polyglutamine and ubiquitin aggregate accumulation, respectively. ML: molecular layer, PC: Purkinje cell, GL: granular layer. **(C)** Western-blot analysis and quantification of EAAT2 expression in mice deficient for *Mbn1* or *Mbn2*, relative to age- and sex-matched control littermates. *Mbn1* or *Mbn2* inactivation does not affect EAAT2 protein levels.



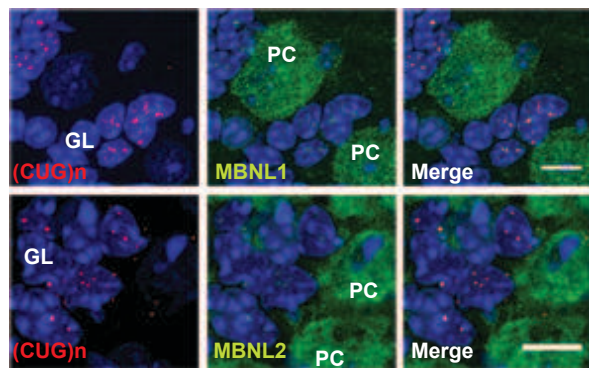


**Figure 1**  
**Sicot et al.**

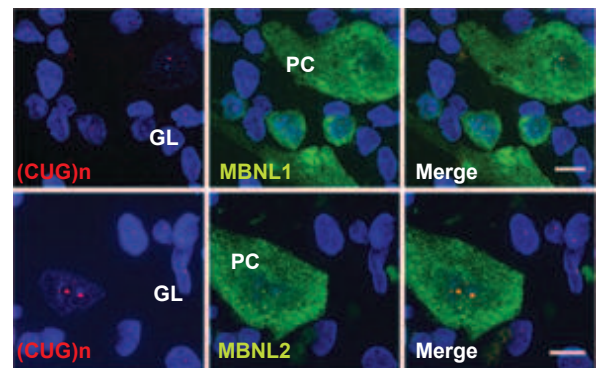
**A**



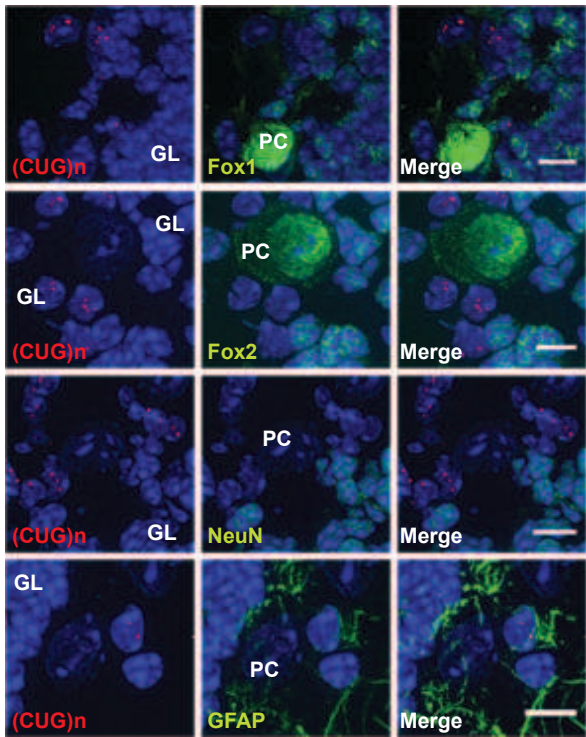
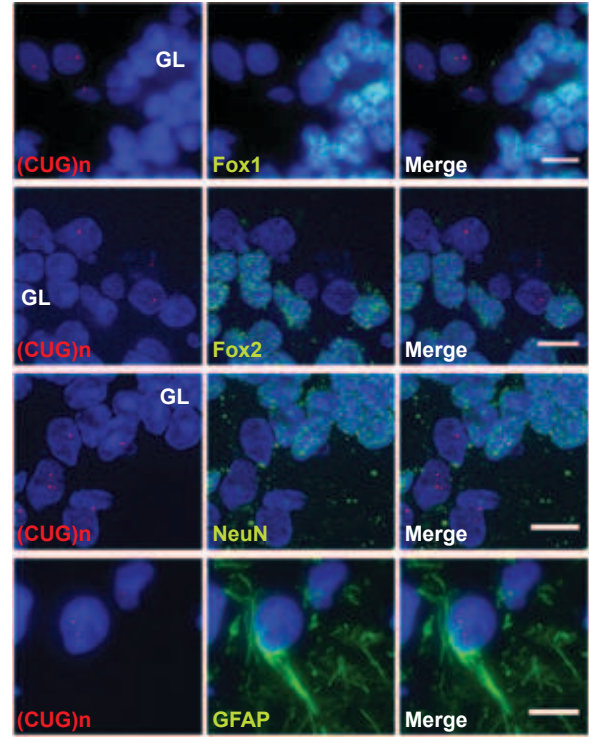
**B**



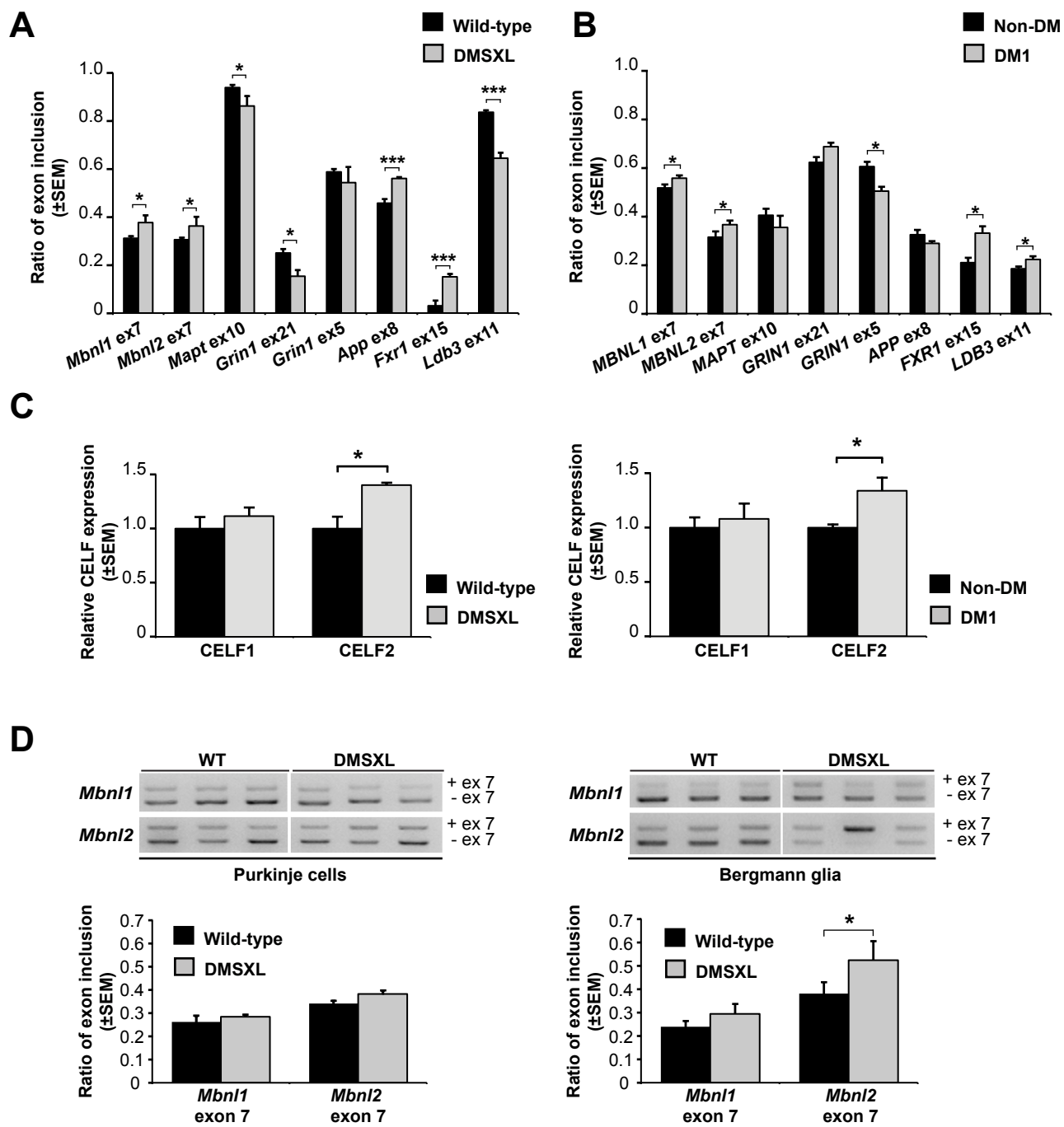
**C**



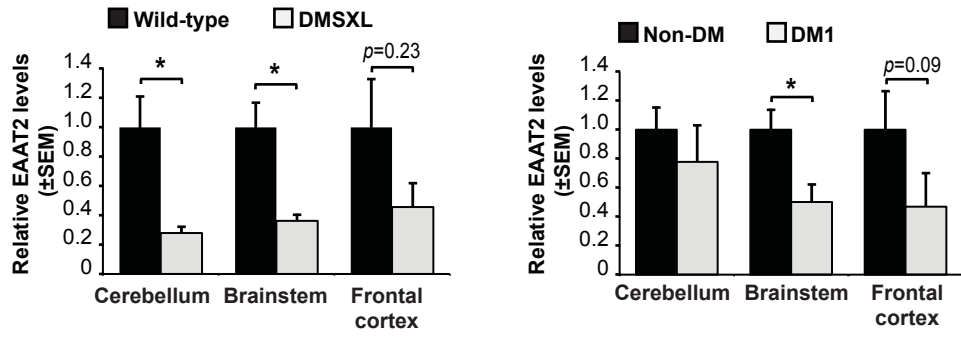
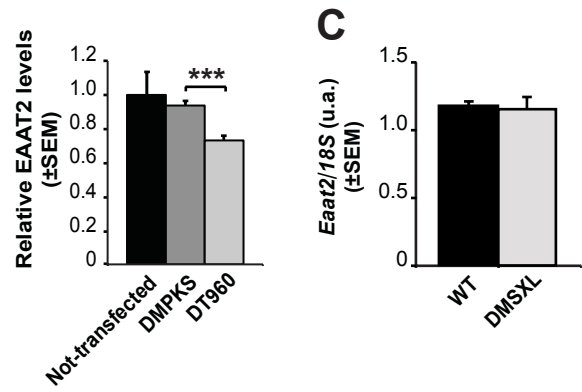
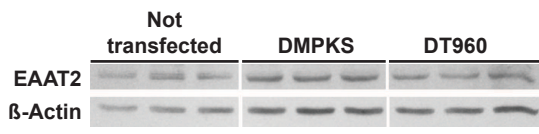
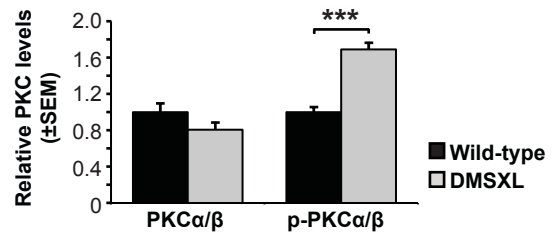
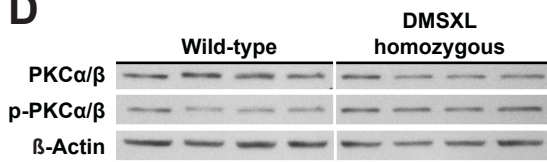
**Figure 2**  
**Sicot et al.**

**A****B**

**Figure 3**  
**Sicot et al.**

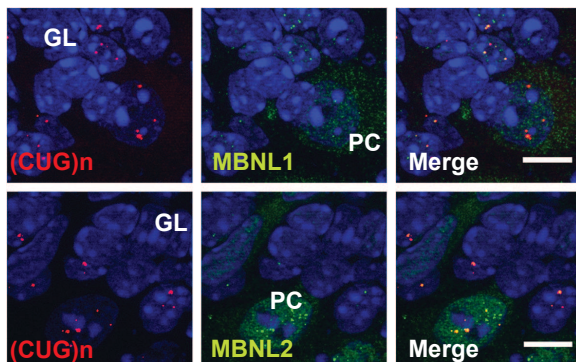
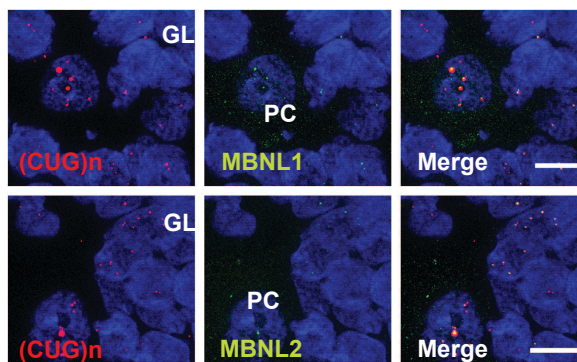
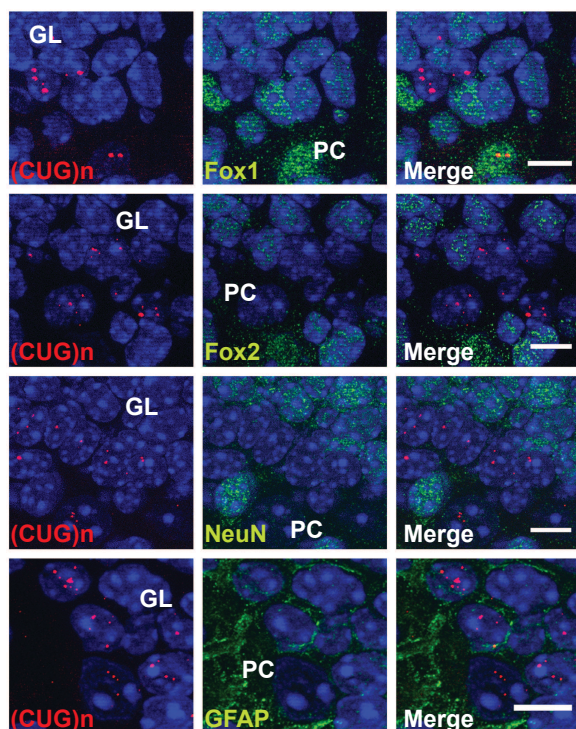
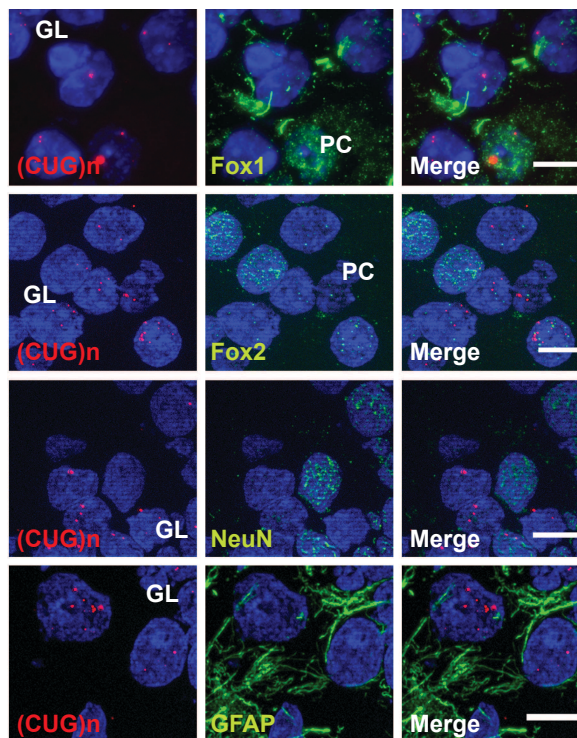


**Figure 4**  
Sicot *et al.*

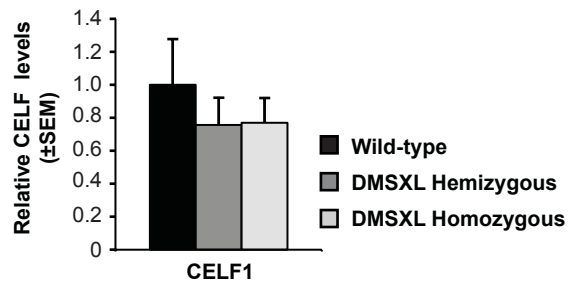
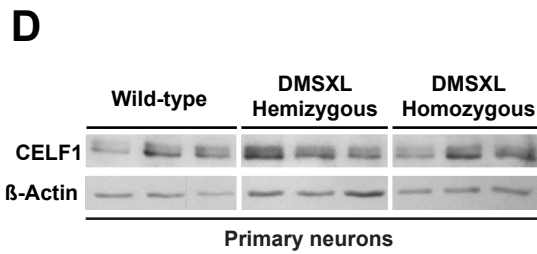
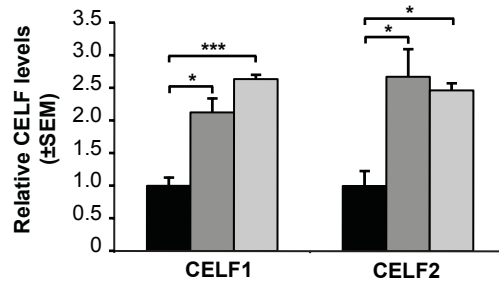
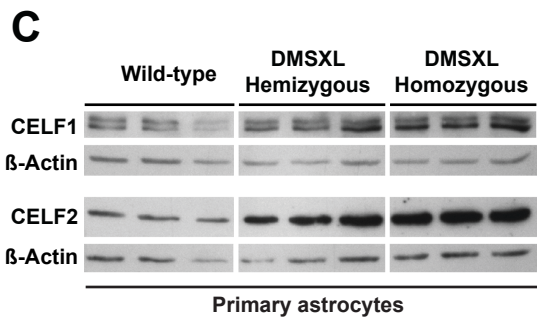
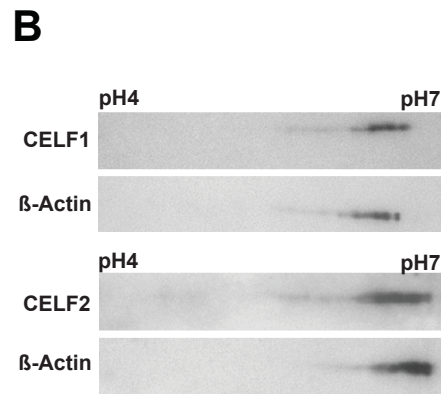
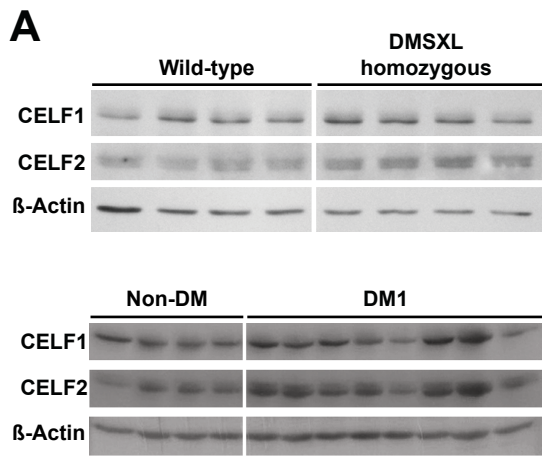
**A****B****D**

**Figure 5**  
**Sicot et al.**



**A****B****C****D**

**Figure S1**  
*Sicot et al.*



**Figure S2**  
*Sicot et al.*

## CHAPITRE VI.

### Etude de l'homéostasie calcique en présence des expansions CTG

#### **RESUME** |

Plusieurs études sur les muscles de patients DM1 ont permis de mettre en évidence la dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans la signalisation calcique. De plus, une étude protéomique réalisée au sein du laboratoire a identifié des changements d'expression et du profil post-traductionnel de protéines impliquées dans l'homéostasie calcique, dans le cerveau des souris transgéniques qui portent des grandes amplifications CTG. Afin de confirmer et caractériser les anomalies de l'homéostasie calcique dans le SNC, une étude a été réalisée par une approche « gènes candidats » et aussi par une approche protéomique globale, sur des souris DMSXL. Des études fonctionnelles de flux calcique ont été réalisées sur un modèle cellulaire de la DM1, développé et caractérisé pour cet effet. Les résultats présentés dans ce chapitre suggèrent une dérégulation calcique dans le SNC dans la DM1, associée à des anomalies d'épissage, d'expression protéique et/ou de la localisation intracellulaire de certains intermédiaires moléculaires qui participent au contrôle du flux calcique. Les conséquences d'une telle dérégulation peuvent potentiellement altérer de nombreuses fonctions du cerveau et contribuer à l'atteinte neurologique de la maladie.



## I. INTRODUCTION

A la recherche de nouveaux intermédiaires et voies dérégulés par la DM1 dans le SNC, une approche protéomique a été réalisée au sein du laboratoire et a mis à jour des différences d'expression et des modifications post-traductionnelles d'une trentaine de protéines. De façon intéressante, ces protéines dérégulées dans le cerveau des souris DMSXL appartiennent à des processus métaboliques importants pour le SNC, à l'image du métabolisme et de la signalisation du calcium.

L'ion calcium est aujourd'hui l'un des éléments primaires de la signalisation cellulaire. Le calcium a la capacité de se lier à plusieurs protéines et influencer leurs localisations, leurs interactions et leurs fonctions et ainsi affecter autant la vie que la mort d'une cellule. En effet, la fusion des noyaux cellulaires lors de la fécondation est entre autre initiée par une montée soudaine de calcium. Ces vagues de libération calcique sont aussi importantes pour les événements de mitoses qui suivent la fécondation. Pendant les stades ultérieurs de développement, le zygote va se diviser en un grand nombre de cellules, dont la spécification sera contrôlée par la signalisation calcique. Plus tard, la différenciation individuelle de chaque cellule, en cellule neuronale ou cellule musculaire par exemple, est aussi largement influencée par des vagues de libération de calcium. Le calcium est aussi un acteur important de la prolifération cellulaire, en partenariat avec d'autres voies de signalisation. Et pour cela, il active de nombreux facteurs de transcription au niveau du cytoplasme ou du noyau. Il intervient aussi dans la transmission neuronale et la croissance axonale. Enfin, l'apoptose fait intervenir de nombreux signaux dont celui calcique. A chaque niveau de régulation, l'homéostasie calcique fait intervenir de nombreux partenaires et rend ainsi la signalisation du calcium très fine, complexe et spécifique à chaque type cellulaire (Berridge et al., 2000 ; Berridge et al., 2003 ; Clapham, 2007).

Il n'est donc pas surprenant qu'une maladie multisystémique comme la DM1 touche aussi la régulation calcique, soit directement en conséquence de l'expression des répétitions CUG toxiques, soit en résultat d'une dérégulation intégrale de la physiologie cellulaire. En effet, dès 1990, Jacobs *et al.* ont mis en évidence une différence de l'homéostasie calcique dans des cellules musculaires en culture de patients adultes DM1 en comparaison avec des contrôles (Jacobs et al., 1990), pouvant participer à la dégénération musculaire observée chez les patients DM1. Puis deux transcrits, *RYR1* et *ATP2A1/SERCA1*, fortement impliqués dans la régulation calcique intracellulaire du muscle, ont montré une altération de leur profil d'épissage dans les muscles de patients DM1 ainsi que des souris *HSA<sup>LR</sup>*, modèle transgénique de la maladie (Kimura et al., 2005). De part la fonction de ces deux transcrits, les défauts moléculaires observés peuvent contribuer à la dérégulation

calcique musculaire et à la dégénération musculaire des patients DM1. Plus récemment, l'altération de l'épissage alternatif de *dSERCA* dans un modèle inductible de drosophile de la DM1 a provoqué une baisse de l'expression de son isoforme transmembranaire, résultant en une altération de la propriété contractile des muscles (Picchio et al., 2013). Puis, une analyse microarray faite sur des biopsies de muscles de patients DM1 et DM2 (Botta et al., 2007) a révélé l'expression altérée de gènes importants impliqués dans le métabolisme du calcium. De manière similaire, plusieurs modèles murins de la DM1 ont montré un profil ARNm anormal de diverses cibles participant au métabolisme du calcium dans les muscles squelettiques (Osborne et al., 2009). Plus récemment, l'épissage alternatif anormal de l'exon 29 du canal calcium *Cav1.1* a été détecté dans les muscles des patients DM1 mais aussi dans les muscles et le cœur de modèles murins de la DM1. Il semblerait que la dérégulation de ce transcrit participe au phénotype myopathique des patients DM1 (Tang et al., 2012). Enfin, différentes drogues modificatrices du phénotype oculaire dû à l'expression des expansions CUG dans la drosophile ont été identifiées. Parmi elles, plusieurs ont la capacité d'affecter le métabolisme du calcium et du sodium (Garcia-Lopez et al., 2008). L'ensemble de ces résultats suggère qu'une dérégulation calcique au sein des muscles participe au phénotype musculaire des patients DM1.

Moins de choses sont connues sur l'effet des expansions CTG sur l'homéostasie calcique dans le SNC. Une précédente étude a montré l'altération de l'expression de gènes, codant pour des canaux calciques, dans les cellules PC12 exprimant (CTG)<sub>960</sub> (Andrade et al., 2007). Cela aurait pour conséquence une réduction de l'expression fonctionnelle de ces canaux associée à une dérégulation de l'homéostasie calcique. Enfin, plusieurs défauts de l'épissage alternatif de transcrits impliqués dans le métabolisme du calcium ont été détectés dans le cerveau dans deux modèles murins de la DM1, déficients pour *Mbnl1* (Suenaga et al., 2012) et pour *Mbnl2* (Charizanis et al., 2012).

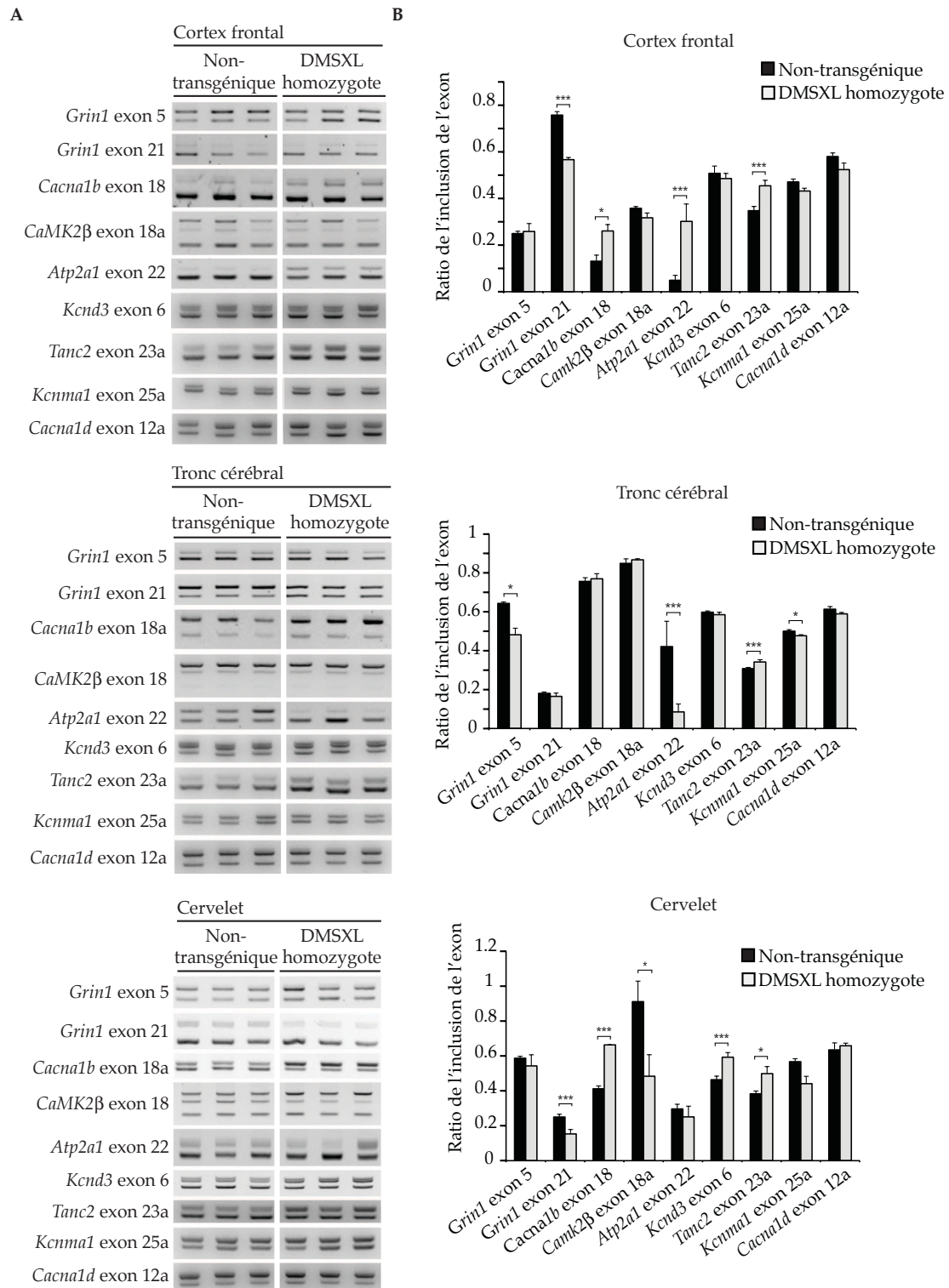
L'ensemble de ces résultats, combiné à ceux de l'approche protéomique effectuée au sein du laboratoire, m'a poussée à explorer, l'homéostasie calcique dans la DM1 par différentes approches.

## II. RESULTATS

### II.1. Investigation du métabolisme ARN anormal : une approche gène candidat

Une des approches développées pour étudier l'impact des expansions CTG sur la signalisation calcique est l'étude de l'épissage alternatif de différents candidats. Cette analyse réalisée au sein de différentes régions du cerveau a révélé des différences significatives dans le profil d'épissage de transcrits chez les souris DMSXL homozygotes versus les souris contrôles non-transgéniques (cf. Chapitre V.). Un certain nombre de ces transcrits mal épissés se sont avérés avoir un lien direct ou indirect avec la voie de signalisation du calcium. L'ensemble de ces résultats est présenté dans la Figure II.1.

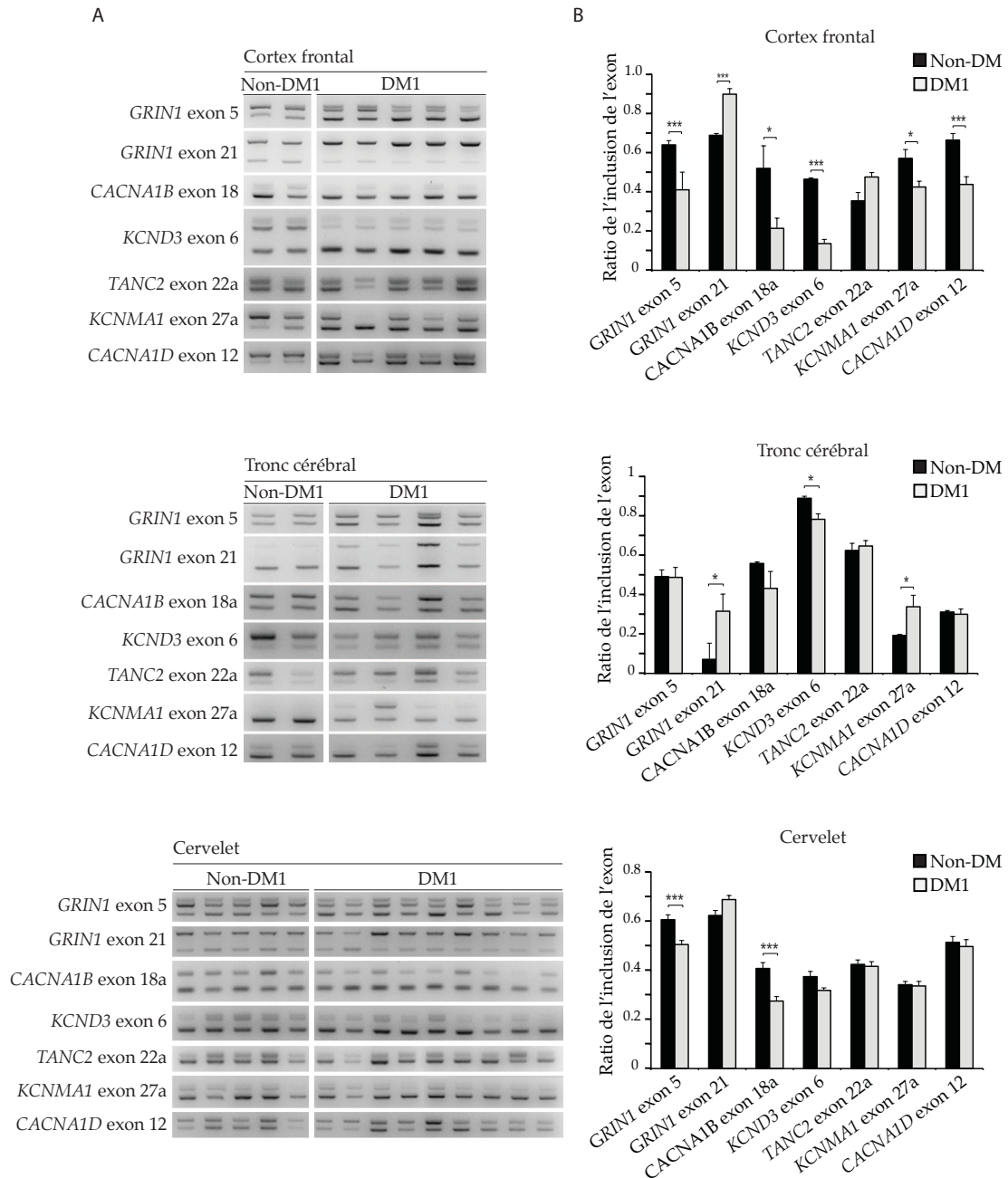
L'épissage alternatif de l'exon 21 du récepteur au glutamate *Grin1/Nmdar1* est altéré dans le cortex frontal ainsi que dans le cervelet, alors que l'épissage de l'exon 5 du même transcrit est lui dérégulé uniquement dans le tronc cérébral. Un sévère défaut d'épissage de l'exon 18a du gène codant pour un canal calcium voltage dépendant, *Cav2.2/CACNA1B*, est observé dans le cervelet, et dans le cortex frontal de façon plus modérée. L'augmentation anormale de l'inclusion de l'exon 18 du gène *CaMK2 $\beta$* , kinase dont l'activation est médiée par le calcium, est détectée uniquement dans le cervelet des souris DMSXL, alors qu'à l'inverse le défaut d'épissage de l'exon 22 du transcrit *Atp2a1/Serca1*, une pompe calcique, est uniquement présent dans les régions du cortex frontal et du tronc cérébral. Le transcrit *Tanc2*, protéine synaptique, montre aussi une altération de l'inclusion de l'exon 23a dans les trois régions étudiées chez les souris DMSXL.



**Figure II.1. Etude de l'épissage alternatif dans le cervelet, le cortex frontal et le tronc cérébral des souris DMSXL homozygotes et des souris contrôles non-transgéniques à l'âge d'un mois. (A) Analyse des produits de RT-PCR dans le cortex frontal, le tronc cérébral et le cervelet (n=3, pour chaque génotype). (B) Quantification de l'inclusion des exons alternatifs des transcrits ARNm codant pour GRIN1/NMDAR1, Cav2.2/CACNA1B, CAMK2B, KCND3, ATP2A1/SERCA1, TANC2, KCNMA1 et Cav1.3/CACNA1D dans le cortex frontal, le tronc cérébral et le cervelet. Les résultats sont présentés  $\pm$  l'erreur type sur la moyenne (\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).**

Le défaut d'épissage de l'exon 6 du transcrit *Kcnd3*, canal potassique voltage dépendant, a seulement été observé de manière significative dans le cervelet des souris DMSXL. Enfin, l'exon 25a du gène *Kcnma1*, canal potassique calcium dépendant, montre un léger défaut dans le tronc cérébral, alors que l'exon 12a du gène *Cav1.3/Cacna1d*, un autre canal calcium voltage dépendant, est anormalement inclus de manière très variable chez les souris DMSXL au sein du cortex frontal (2 souris sur 3 montrent une anomalie prononcée). De part leur fonction, leur interaction ou leur mode de régulation, l'ensemble de ces gènes dérégulés dans au moins une des régions cérébrales des souris DMSXL ont tous un lien avec l'homéostasie calcique au niveau du SNC, suggérant sa dérégulation dans la DM1.

Pour confirmer que la dérégulation de l'épissage alternatif observée dans les souris DMSXL recréait des événements moléculaires caractéristiques de la DM1, j'ai validé un certain nombre de ces résultats dans le cervelet, le cortex frontal et le tronc cérébral de patients DM1 en comparaison avec des contrôles non-DM (Figure II.2.). L'analyse de l'épissage alternatif par RT-PCR a confirmé les défauts d'épissage concernant l'exon 5 du transcrit *GRIN1/NMDAR1* dans le cortex frontal et le cervelet, mais aussi l'exon 21 du même transcrit dans le cortex frontal et le tronc cérébral. Le défaut observé pour l'exon 21 de *Grin1/Nmdar1* est différent entre les souris DMSXL et les patients DM1. En effet, pendant que l'exon 21 présente une exclusion augmentée dans le cerveau des souris DMSXL, son inclusion est anormalement élevée dans le cerveau des patients DM1. Un défaut d'épissage de l'exon 18a du transcrit *Cav2.2/CACNA1B* est aussi observé dans le cortex frontal et le cervelet chez les patients DM1. Cependant, alors qu'une inclusion augmentée de l'exon 18a est observée chez les souris DMSXL, une inclusion diminuée est observée chez les patients DM1. Une différence significative du profil d'épissage de l'exon 6 du transcrit *KCND3* est observée dans le cortex frontal et le tronc cérébral des patients DM1 en comparaison aux contrôles. En effet, une baisse de l'inclusion de cet exon est observée dans le cortex frontal et le tronc cérébral des patients DM1, situation opposée à celle observée dans le cerveau des souris DMSXL. Enfin, deux sévères défauts d'épissage supplémentaires sont détectés dans le cortex frontal des patients DM1 et concernent l'exon 12 du transcrit *Cav1.3/CACNA1D* et l'exon 27a du transcrit *KCNMA1*. L'ensemble de ces défauts d'épissage n'est pas nécessairement retrouvé dans les trois régions cérébrales des patients DM1, suggérant, comme dans le cerveau des souris DMSXL, une spécificité régionale de la toxicité de l'ARN sur l'épissage alternatif de certains transcrits.



**Figure II.2. Etude de l'épissage alternatif de transcrits cibles dans le SNC de patients DM1 et des contrôles non-DM1. (A)** Analyse des produits de RT-PCR de la région du cortex frontal, du tronc cérébral et du cervelet chez les patients DM1 (respectivement  $n=10$ ,  $n=5$ ,  $n=4$ ) et les contrôles non DM (respectivement  $n=5$ ,  $n=2$ ,  $n=2$ ). **(B)** Quantification de l'inclusion des exons alternatifs des transcrits ARNm codant pour GRIN1/NMDAR1, Cav2.2/CACNA1B, KCND3, TANC2, KCNMA1, Cav1.3/CACNA1D. Les résultats sont présentés  $\pm$  l'erreur type sur la moyenne (\*  $p<0.05$ , \*\*\*  $p<0.001$ ).

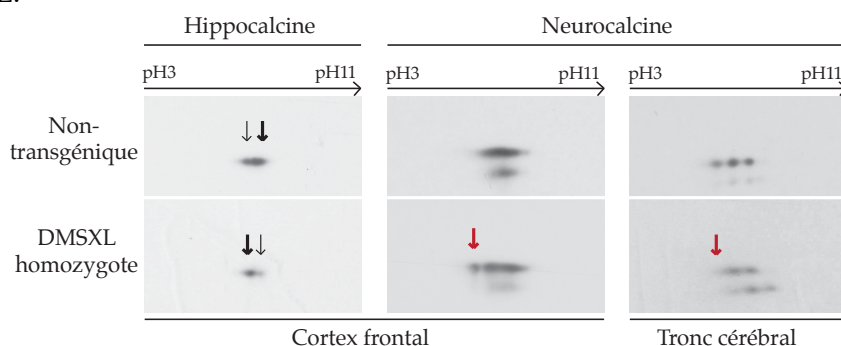
Ces données suggèrent une possible dérégulation du métabolisme des transcrits impliqués dans la régulation calcique dans le SNC des malades.

## II.2. Approche protéomique globale

Dans le but de confirmer l'implication d'une dérégulation de l'homéostasie calcique dans la neuropathogenèse de la DM1, certains résultats, obtenus lors de l'approche protéomique globale réalisée sur des souris porteuses de grandes répétitions CTG ont été validés par électrophorèse à deux dimensions et western-blot quantitatif dans le SNC des souris DMSXL, versus des souris contrôles non-transgéniques.

### II.2.1. Modification post-traductionnelle de l'hippocalcine et de la neurocalcine dans le SNC des souris DMSXL

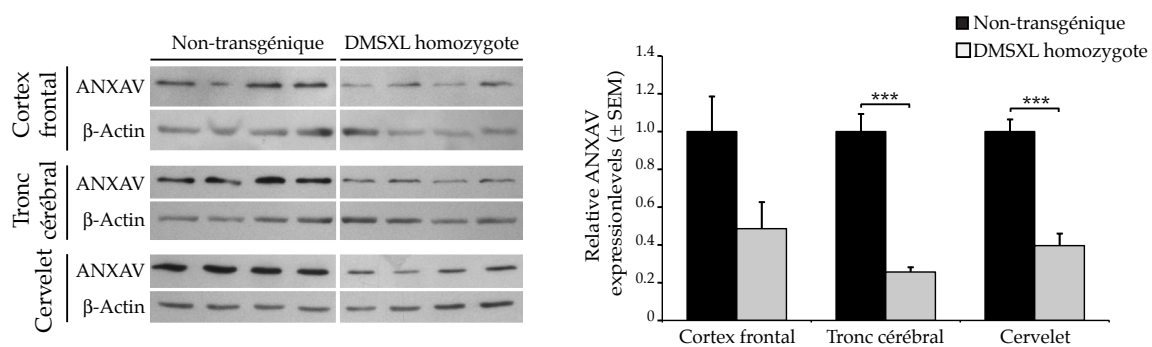
Lors de l'approche protéomique globale, des modifications post-traductionnelles ont été détectées pour deux protéines senseurs de calcium : l'hippocalcine et la neurocalcine (Figure II.3.). Des ratios différents ont été détectés pour deux isoformes de l'hippocalcine au sein du cortex frontal des souris DMSXL versus les contrôles non-transgéniques. Dans la même région, une isoforme supplémentaire plus acide de la neurocalcine a été observée chez les souris DMSXL. Enfin, alors que trois isoformes de neurocalcine sont détectées dans le tronc cérébral des souris contrôles non-transgéniques, seulement deux le sont chez les souris DMSXL. La nature de ces modifications n'a pas été déterminée. Cependant, indépendamment de la nature de ces altérations moléculaires, et compte tenu du rôle de l'hippocalcine et de la neurocalcine en tant que senseurs de calcium, les modifications détectées suggèrent une dérégulation calcique dans le SNC des souris DMSXL.



**Figure II.3. Profil des protéines hippocampales et neurocalcine dans le SNC des souris DMSXL.** Electrophorèse en deux dimensions sur le cortex frontal et le tronc cérébral d'un pool de trois souris DMSXL et de trois souris contrôles non-transgéniques adultes. Hippocalcine : ratio d'expression différent pour deux isoformes détectées dans le cortex frontal des souris DMSXL comparé aux contrôles (flèche noire épaisse pour une plus forte expression versus flèche noire fine pour une plus faible expression). Hippocalcine n'a pas généré de signal dans le tronc cérébral. Neurocalcine : une isoforme supplémentaire observée dans le cortex frontal des souris DMSXL (flèche rouge), et seulement deux isoformes dans le tronc cérébral des souris DMSXL comparé aux contrôles.

## II.2.2. Baisse de l'expression de l'Annexin V dans le SNC des souris DMSXL

L'approche protéomique globale en gels bidimensionnels a aussi mis en évidence l'expression anormale de la protéine Annexin V (ANXAV), en particulier dans le cervelet. Cette protéine a la capacité de se lier à la membrane cellulaire, de manière dépendante du calcium, et forme aussi un canal calcium voltage dépendant dans la bicouche lipidique (Gerke et al., 2005). Les résultats ont été validés par western blot dans le SNC des souris DMSXL homozygotes (Figure II.4). Une baisse significative de l'expression de l'Annexin V est observée dans le tronc cérébral et le cervelet des souris DMSXL. Une forte tendance à la baisse du niveau d'expression de cette protéine est décrite dans le cortex frontal des souris DMSXL ( $p=0.09$ ).



**Figure II.4. Expression de l'Annexin V dans le SNC des souris DMSXL.** Analyse de l'expression par des western blot réalisé dans le cortex frontal, le tronc cérébral et le cervelet des souris DMSXL homozygotes (n=4) versus les souris contrôles non transgéniques (n=4). L'analyse quantitative des niveaux d'expression rapportés à l'expression de la β-Actin, contrôle interne, montre une baisse significative du niveau d'expression de l'Annexin V dans le tronc cérébral et le cervelet des souris DMSXL homozygotes et une tendance à la baisse dans le cortex frontal des souris DMSXL ( $p=0.09$ ). Les résultats sont présentés  $\pm$  l'erreur type sur la moyenne (\*\*\*)  $p<0.001$ .

Ainsi, l'ensemble des données sur l'épissage anormal de transcrits impliqués dans l'homéostasie calcique associées aux anomalies protéiques décrites ci-dessus, suggère une dérégulation des niveaux calciques dans les cellules chez les souris DMSXL. Pourtant, on ne sait pas si les anomalies moléculaires décrites (des ARNs ou des protéines) sont la conséquence directe de l'expression de transcrits amplifiés de *DMPK*, ou le résultat indirect des niveaux anormaux de calcium, suite à la dérégulation global de la physiologie cellulaire.

Parmi les gènes mal épissés dans la DM1, on trouve celui du récepteur de glutamate GRIN1/NMDAR1, un des régulateurs centraux du flux calcique, et qui peut être impliqué dans l'homéostasie anormale du calcium en présence des amplifications CTG. Afin d'étudier cette hypothèse, un modèle cellulaire cérébral de la DM1 a été établi et caractérisé.



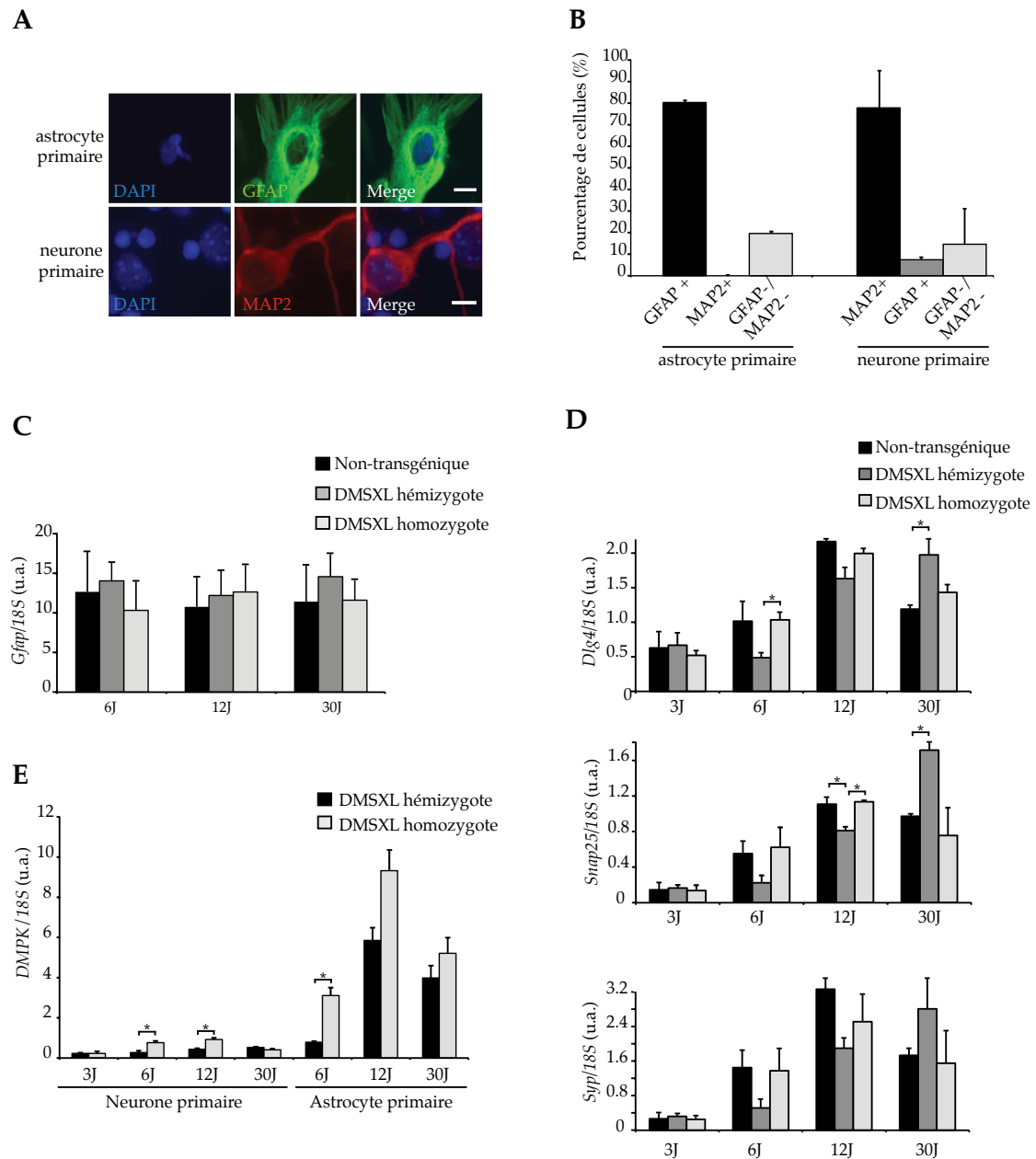
### II.3. Caractérisation d'un modèle cellulaire cérébral de la DM1

Ce modèle cellulaire consiste en des cultures primaires d'astrocytes et de neurones, dérivées à partir du cerveau entier d'embryons DMSXL et contrôles non-transgéniques, à 16.5 jours de développement *in utero*. L'établissement de ce modèle permet non seulement l'étude de la toxicité ARN, l'étude de la localisation de protéines avec un épissage alternatif anormal, mais aussi la mesure du flux calcique en réponse à différents stimuli, en la présence du transcrit *DMPK* contenant les expansions CUG.

#### II.3.1. Différentiation des cultures primaires

Pour caractériser ce modèle cellulaire cérébral de la DM1, une première analyse morphologique des cultures primaires astrocytaires et neuronales a été réalisée par un marquage immunocytochimique pour la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), caractéristique des cellules gliales et MAP2 (Microtubule-Associated Protein 2), spécifique des cellules neuronales (Figure II.5.A). Plus de 80% des cellules astrocytaires expriment le marqueur GFAP, et plus de 80% des cellules neuronales expriment le marqueur MAP2 (Figure II.5.B).

La nature astrocytaire ou neuronale des cultures a été confirmée par l'analyse de l'expression quantitative en temps réel de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation gliale (*Gfap*) (Figure I.5.C.) et neuronale [*Snap25* (*Synaptosomal-associated protein 25 kDa*), *Syp* (*Synaptophysine*), *Dlg4* (*Discs large homolog 4*) connu aussi sous le nom de *Psd-95* (*Postsynaptic density protein 95*)] (Figure II.5.D.) au cours du temps passé en culture. Pour les cultures astrocytaires, les résultats indiquent une expression de *Gfap* dès 6 jours de culture, et qui perdure au moins jusqu'à un mois de culture, signe d'une différenciation astrocytaire. Aucune différence d'expression n'a été détectée entre les cultures issues d'embryons non-transgéniques comparés aux cultures issues d'embryons DMSXL hémizygotés ou homozygotés, au cours du temps en culture. Pour les cultures neuronales, l'analyse quantitative de l'expression de *Syp*, *Dlg4* et *Psd-95* a révélé une augmentation progressive de leur expression au cours du temps de culture, notamment pendant les 12 premiers jours, signe d'une différenciation neuronale des cellules primaires issues des différents embryons. Il n'a pas été observé de différences majeures dans l'expression des marqueurs de la différenciation neuronale des cultures issues d'embryons non-transgéniques comparées aux DMSXL.



**Figure II.5. Analyse de la différenciation cellulaire des cultures primaires astrocytaires et neuronales.** (A) Analyse morphologique des cultures primaires astrocytaires et neuronales par un marquage immunocytochimique pour la GFAP, caractéristique des cellules gliales et MAP2, spécifique des cellules neuronales. La barre d'échelle est de 10  $\mu$ m. (B) Quantification du pourcentage des cellules primaires GFAP positives et MAP2 positives dans les cultures primaires astrocytaires et neuronales. (C-D) Analyse de l'expression du marqueur de différenciation astrocytaire *Gfap* (C) et de trois marqueurs de la différenciation neuronale, *Dlg4*, *Snap25* et *Syp* (D), rapportée au contrôle interne *18S*, par PCR quantitative en temps réel, sur des cultures primaires non transgéniques (n=3), DMSXL hémizygotes (n=3) et DMSXL homozygotes (n=3) cultivées pendant 3, 6, 12 ou 30 jours (3J, 6J, 12J, 30J) pour les neurones et pendant 6, 12 et 30 jours de culture pour les astrocytes. Les résultats sont présentés  $\pm$  l'erreur type sur le moyenne, en unités arbitraires (u.a.). (E) Profil d'expression de *DMPK* sur des cultures primaires d'astrocytes et de neurones, dérivés d'embryons DMSXL hémizygotes (n=3) et homozygotes (n=3), après 3, 6, 12 ou 30 jours de culture pour les neurones et après 6, 12 et 30 jours de culture pour les astrocytes. Les résultats sont présentés  $\pm$  l'erreur type sur la moyenne, rapportés à l'expression du gène de référence *18S*, en unités arbitraires (u.a.) (\*,  $p < 0.05$ ).

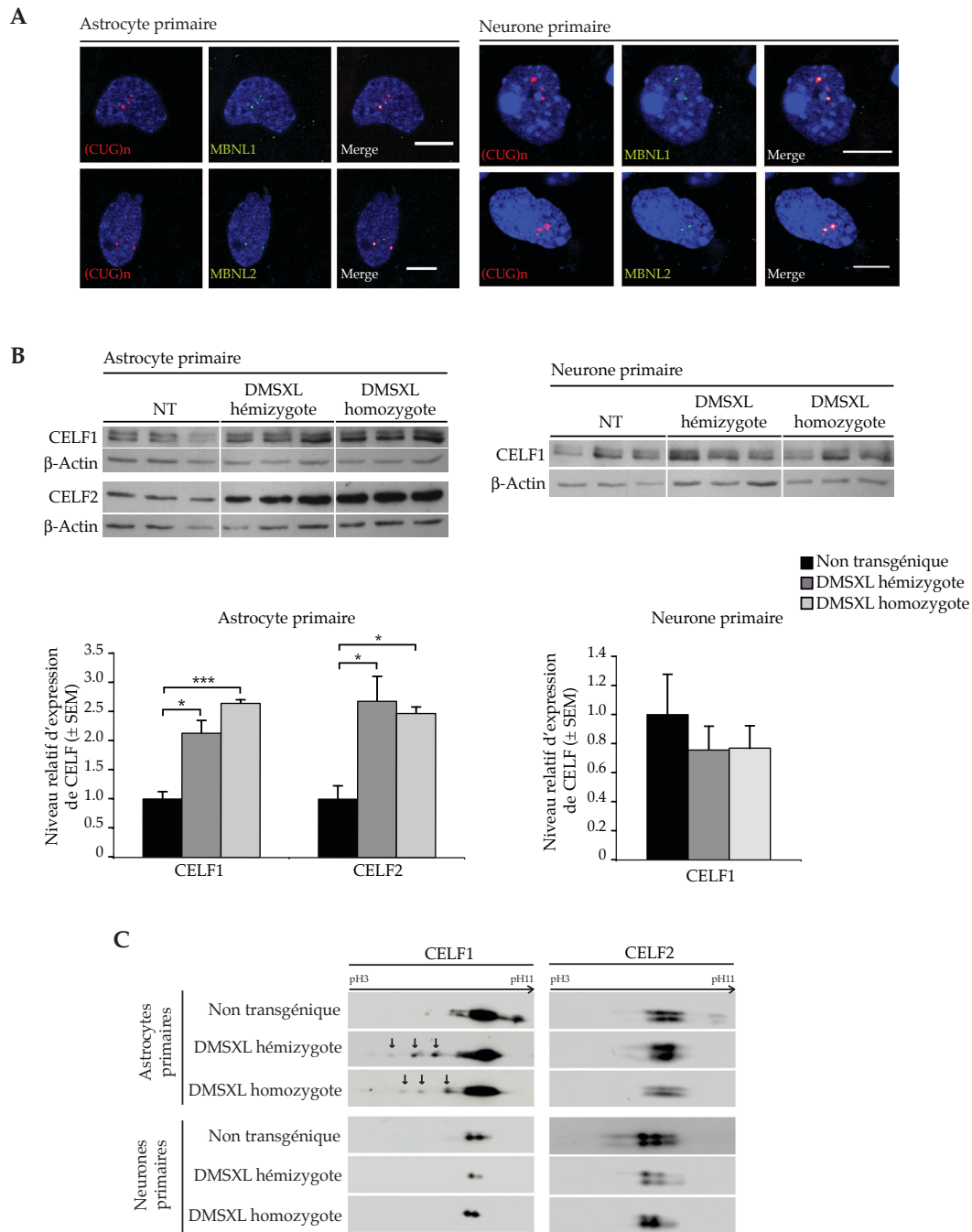
Enfin, parce que ce modèle cellulaire de la DM1 servira entre autres à l'étude de la toxicité ARN dans les deux types cellulaires, l'expression des expansions CTG toxiques a été réalisée. L'expression du transgène humain *DMPK*, porteur des expansions CTG, a été analysée par PCR quantitative en temps réel sur les astrocytes primaires et les neurones primaires, après différents temps de culture (Figure II.5.E.). Il est intéressant d'observer une nette différence d'expression du transgène entre les deux types cellulaires. En effet, *DMPK* s'exprime très faiblement au sein des neurones primaires comparés aux astrocytes primaires. On retrouve une différence logique dans l'expression du transgène entre les embryons DMSXL hémizygotés (avec une copie du transgène) et ceux homozygotés (avec deux copies). En effet, l'expression de *DMPK* est plus forte dans les cultures issues d'embryons DMSXL homozygotés comparés à celles issues d'embryons hémizygotés. Enfin, il semblerait que l'expression de *DMPK* soit maximale après 12 jours de culture pour les astrocytes primaires, alors qu'elle ne semble pas varier de manière évidente au cours du temps au sein des neurones primaires.

### **I.3.2. Signes de la toxicité des ARNs porteurs des CUG dans les cellules cérébrales primaires des souris DMSXL**

Les signes typiques de la toxicité des ARNs proposés pour être des événements initiateurs dans la DM1 résultant en l'accumulation nucléaire des transcrits avec les expansions (Sicot et al., 2011), ont été recherchés au sein des cultures primaires d'astrocytes et de neurones. Une FISH a été réalisée sur les deux types cellulaires primaires après 12 jours de culture pour détecter l'accumulation nucléaire du transcrit *DMPK* contenant les expansions CUG (Figure II.6.A.). Des foci d'ARN ont été détectés dans environ 90% des astrocytes et 60% des neurones primaires dérivés des embryons DMSXL hémizygotés ainsi qu'homozygotés. Aucune différence significative du nombre de cellules contenant des foci ou du nombre de foci par cellules n'a été détectée entre les cultures primaires DMSXL hémizygotés et homozygotés (résultats non présentés). Cette accumulation toxique est associée à la séquestration de deux facteurs régulateurs de l'épissage: MBNL1 et MBNL2 (Figure II.6.A.). Pour compléter la caractérisation de ce modèle, le niveau d'expression des protéines CELF, connues pour être surexprimées en conséquence de l'expression des expansions CTG, a été analysé dans les cultures primaires d'astrocytes et de neurones DMSXL et non-transgéniques (Figure II.6.B.). L'analyse quantitative du niveau d'expression des protéines CELF a révélé une surexpression significative de CELF1 et CELF2 dans les astrocytes DMXSL en comparaison avec

ceux non transgéniques (Figure II.6.B). Pendant que les niveaux d'expression de CELF1 dans les cultures primaires de neurones ne varient pas de manière significative, l'analyse de l'expression de CELF2 dans les cultures primaires de neurones n'a pas pu être réalisée faute de signal détectable et quantifiable. La surexpression de CELF1 est associée à son hyperacidification dans les cultures primaires astrocytaires DMSXL (Figure II.6.C.). Malgré sa surexpression dans les cultures d'astrocytes DMSXL, le profil de CELF2 après électrophorèse bidimensionnelle n'a montré aucune différence entre les astrocytes primaires des différents génotypes. CELF1 et CELF2 ne présentent pas de différences évidentes de leur profil isoélectrique dans les cultures primaires de neurones (Figure II.6.C.).

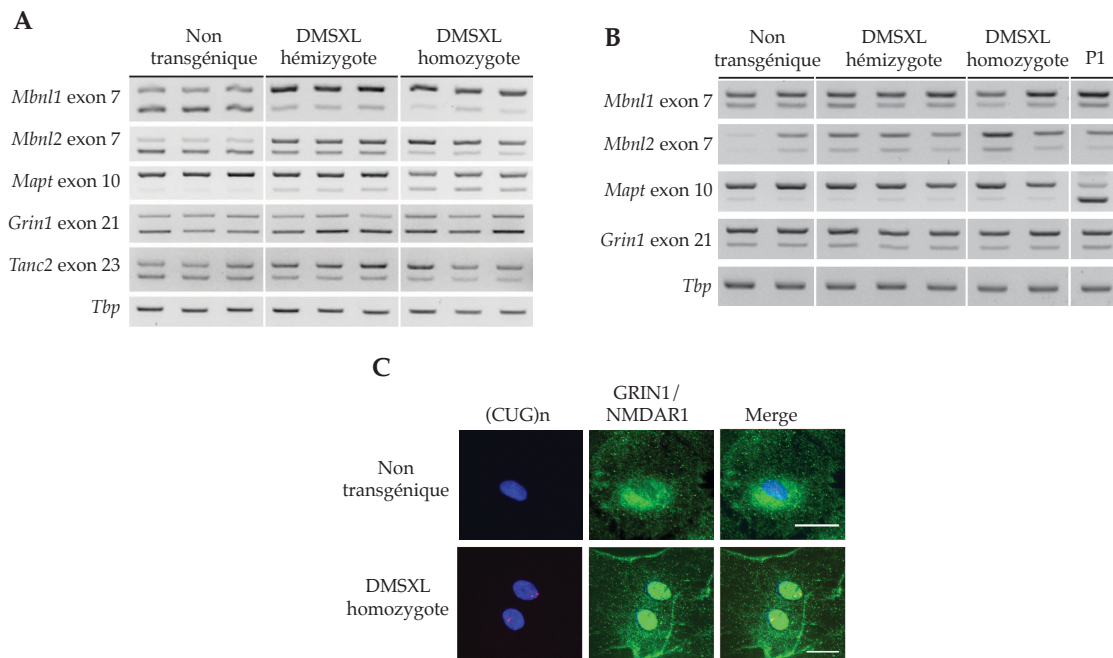
L'ensemble de ces résultats témoigne des marques de la toxicité de l'ARN plus particulièrement dans les cultures primaires d'astrocytes. En effet, ces derniers expriment le transgène *DMPK* à un niveau élevé ; ils présentent des foci d'ARN nucléaires associés à la séquestration des protéines MBNL1 et MBNL2 ; et montre une surexpression de CELF1 et CELF2, associée à une hyperacidification des isoformes de CELF1. Les cultures primaires astrocytaires semblent alors être un bon modèle cellulaire de la toxicité des ARNs CUG dans la DM1. Afin de confirmer l'utilité des astrocytes primaires DMSXL pour l'étude de la toxicité des ARN dans la DM1, j'ai tout d'abord vérifié si l'expression et l'accumulation des transcrits *DMPK* amplifiés induisent des défauts d'épissage dans les astrocytes primaires DMSXL. En effet, une inclusion augmentée de l'exon 7 du transcrit *Mbnl1*, de l'exon 7 du transcrit *Mbnl2* et de l'exon 23 du transcrit *Tanc2* et une exclusion augmentée de l'exon 10 du transcrit *Mapt/Tau* et de l'exon 21 du transcrit *Grin1/Nmdar1* ont été observées dans les astrocytes DMSXL homozygotes en comparaison avec les astrocytes non transgéniques (Figure II.7.A).



**Figure II.6. Détection de plusieurs signes de la toxicité ARNm dans les cultures primaires DMSXL.** (A) Accumulation de foci d'ARN nucléaires associée à la séquestration des protéines MBNL. Foci d'ARN *DMPK* (rouge) ont été détectés par hybridation fluorescente *in-situ* (FISH), alors que MBNL1 et MBNL2 (vert) ont été détectés par immunofluorescence (IF), dans les culture primaires d'astrocytes (panneau de gauche) et de neurones (panneau de droite) dérivés d'embryons DMSXL homozygotes. La barre d'échelle est de 5 μm. (B) Quantification par western blot de l'expression de CELF1 et CELF2 sur les cultures d'astrocytes et de neurones primaires dérivées d'embryons non-transgéniques (n=3), DMSXL hémizygotes (n=3) et DMSXL homozygotes (n=3). Les niveaux d'expression de CELF1 et CELF2 sont rapportés à l'expression de la β-Actin, contrôle interne. Les résultats sont présentés ± l'erreur type sur la moyenne (\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). (C) Electrophorèse en deux dimensions et immunodétection de CELF1 et CELF2 dans les cultures primaires astrocytaires et neuronales issues d'embryons non transgéniques (pool de n=3 embryons), DMSXL hémizygotes (pool de n=3 embryons) et DMSXL homozygotes (pool de n=3 embryons). Les flèches noires indiquent la présence d'isoformes

CELF1 hyperacide, détectée dans les cultures primaires astrocytaires issues d'embryons DMXSL hémizygotés ou homozygotés.

En contraste avec les astrocytes DMSXL, les cultures primaires de neurones DMSXL ne montrent pas d'anomalies de l'épissage des transcrits étudiés, même après 21 jours de culture (Figure II.7.B.). La majorité des transcrits étudiés dans les cellules neuronales garde un profil d'épissage fœtal. Seul l'épissage alternatif de l'exon 10 de *Mapt/tau* réalise la transition vers un profil d'épissage adulte dans ce type cellulaire.



**Figure II.7. Défaut d'épissage et étude des conséquences sur la localisation de GRIN1/NMDAR1 dans les cultures primaires d'astrocytes.** (A-B) Analyse de l'inclusion des exons 7 des transcrits *Mbnl1* et *Mbnl2*, de l'exon 21 de *Grin1/Nmdar1*, de l'exon 10 de *Mapt/Tau* et de l'exon 23 de *Tanc2* (uniquement dans les astrocytes) dans (A) les astrocytes issus d'embryons non transgénique (n=3), DMSXL hémizygotés (n=3) et DMSXL homozygotés (n=3), (B) les neurones issus d'embryons non transgénique (n=2), DMSXL hémizygotés (n=3) et DMSXL homozygotés (n=2) et le cortex frontal d'un pool de 3 souris non transgénique à 1 jour postnati (P1). (C) Immunodétection du récepteur GRIN1/NMDAR1. Les foci d'ARN *DMPK* (rouge) ont été détectés par hybridation fluorescente *in-situ* (FISH), alors que GRIN1/NMDAR1 (vert) a été détecté par immunofluorescence (IF), dans les cultures primaires d'astrocytes dérivés d'embryons non transgéniques et DMSXL homozygotés. L'immunofluorescence révèle une différence dans la localisation cellulaire du récepteur NMDA entre les deux types de cultures. La barre d'échelle est de 10  $\mu$ m.

Il a été décrit que les défauts d'épissage de l'exon 21 du transcrit *Grin1/Nmdar1* et de l'exon 23 de *Tanc2* peuvent avoir un rôle direct dans la localisation du récepteur GRIN1/NMDAR1. En effet, il a été montré que les exon 5 et 21 de GRIN1/NMDAR1 pouvaient être impliqués dans sa localisation cellulaire (Zhang et al., 2002 ; Zukin and Bennett, 1995). De plus, la protéine TANC2 est aussi impliquée dans la localisation synaptique de ce récepteur (Han et al., 2010). Par conséquent, il semblait intéressant de regarder la distribution cellulaire de GRIN1/NMDAR1 dans les cultures primaires d'astrocytes précédemment

caractérisées (Figure II.7.C.), ou l'épissage anormal des transcrits *Grin1/Nmdar1* et *Tanc2* est particulièrement prononcé. L'immunodétection du récepteur GRIN1/NMDAR1 a révélé une différence de localisation cellulaire en présence des répétitions CTG. En effet, GRIN1/NMDAR1 montre une distribution plus diffuse dans les cellules contrôles non-transgéniques, même si le récepteur présente une concentration élevée dans l'espace péri nucléaire. En contraste, dans les cultures primaires d'astrocytes issus d'embryons DMSXL homozygotes, la protéine est anormalement localisée presque exclusivement au niveau du compartiment nucléaire. Ce défaut de localisation du récepteur GRIN1/NMDAR1 peut donc avoir des conséquences fonctionnelles et potentiellement affecter l'homéostasie calcique dans ces cellules.

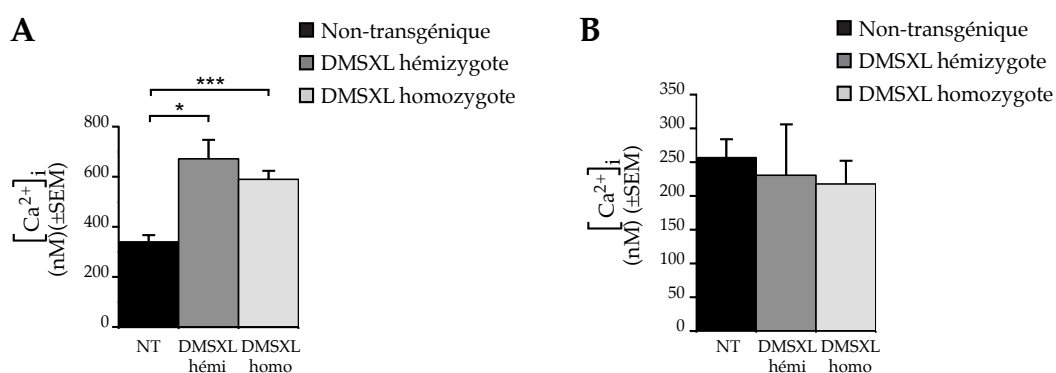
#### II.4. Etude du flux calcique sur un modèle cellulaire cérébrale de la DM1.

Des défauts d'épissage de transcrits impliqués dans l'homéostasie calcique, des anomalies d'expression et des modifications post traductionnelles de protéines impliquées dans la signalisation calcique, et le changement de localisation du récepteur GRIN1/NMDAR1 sont autant de signes qui suggèrent fortement une dérégulation de l'homéostasie calcique au sein du SNC dans la DM1. Pour valider cette hypothèse, nous avons tiré avantage du modèle cellulaire cérébral de la DM1, précédemment validé, pour étudier le flux calcique sous différentes conditions de stimulation et en présence ou non de l'expression des expansions CTG. Pour suivre le flux calcique, les astrocytes primaires ont été incubés avec la sonde calcique Fluo4-AM qui permet de suivre les variations de la concentration cytosolique en calcium libre,  $[Ca^{2+}]_i$ , grâce à l'émission de lumière à 515 nm après excitation à 485 nm. Brièvement, lorsque la  $[Ca^{2+}]_i$  augmente, la lumière émise par la sonde fluorescence augmente et cette augmentation peut être traduite en variations de calcium grâce aux différentes calibrations réalisées.

Afin d'étudier la réponse calcique en présence de répétitions pathologiques CTG, l'augmentation de la concentration calcique cytosolique des astrocytes primaires non-transgéniques et DMSXL a été stimulée par l'incubation avec l'adénosine triphosphate (ATP) (100  $\mu$ M), qui active des récepteurs purinergiques (Figure II.8.A.). Une différence significative de la concentration calcique cytosolique maximum a été observée entre les astrocytes primaires issus d'embryons non-transgéniques et ceux issus des embryons DMSXL suite à l'injection d'ATP. En effet, pendant que la concentration calcique cytosolique maximum atteint 340 nM ( $\pm 27$ ) pour les cultures contrôles, elle atteint 670 nM ( $\pm 75$ ) dans les cultures issus

d'embryons DMSXL hémizygotés et 600 nM ( $\pm 34$ ) pour celles issues d'embryons DMSXL homozygotés, suggérant ainsi une anomalie dans la réponse calcique à l'ATP de la part des astrocytes issus d'embryons DMSXL.

Puis, afin de mimer un courant dépolarisateur, activateur des canaux voltage-dépendant, une stimulation par le KCl a été réalisée (Figure II.8.B). Aucune différence significative dans la réponse calcique à ce stimulus n'a été observée entre les différentes cultures primaires. Cela suggère donc que les canaux voltage-dépendant (dont certains présentent des anomalies de l'épissage alternatif dans le cerveau des souris DMSXL), présentent une réponse normale, et ne semblent pas affecter le niveau calcique cellulaire des cultures primaires étudiées.



**Figure II.8. Analyse du flux calcique dans les astrocytes primaires suite à différents stimuli.** Analyse de la réponse ATP (100  $\mu$ M) (A) et KCl (80  $\mu$ M) (B) sur les astrocytes primaires issus d'embryons E16.5 non-transgéniques (NT ; n=3), DMSXL hémizygotés (DMSXL hémi ; n=3) et DMSXL homozygotés (DMSXL homo ; n=3). La concentration calcique cytosolique maximum  $[Ca^{2+}]_i$  (nM) atteinte suite à la stimulation est représentée  $\pm$  l'erreur type sur la moyenne (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



### III. DISCUSSION

Les résultats décrits dans ce chapitre suggèrent fortement une dérégulation calcique dans le SNC en conséquence de l'amplification CTG de la DM1. En effet, plusieurs anomalies de l'épissage alternatif de gènes impliqués dans l'homéostasie calcique ont été détectées dans le SNC des souris DMSXL ainsi que dans le cerveau de patients DM1. Des différences post-traductionnelles, d'expression et de localisation de protéines impliquées dans l'homéostasie calcique ont également été observées dans le cerveau des souris DMSXL, ainsi qu'une différence dans la réponse calcique à l'ATP dans un modèle astrocytaire de la DM1. Les anomalies protéiques détectées peuvent être une conséquence directe ou indirecte de l'amplification CTG. Dans les deux cas, elles suggèrent une dérégulation de la fonction calcique dans le SNC des souris DMSXL.

Plusieurs transcrits ont montré des anomalies de l'épissage alternatif à la fois dans le SNC des souris DMSXL et des patients DM1. Pourtant, les défauts d'épissage ne sont pas exactement les mêmes. Par exemple, alors qu'une inclusion augmentée de l'exon 18a est observée chez les souris DMSXL, une inclusion diminuée est observée chez les patients DM1. Cela illustre une différence de régulation de l'épissage alternatif de certains transcrits. Cette divergence de régulation, déjà observée pour l'exon 11 de *Insr* (Guiraud-Dogan et al., 2007), impliqué dans la dérégulation du métabolisme de l'insuline, est discutée dans le chapitre IV.

Parmi les exons affectés, l'exon 21 du récepteur *Grin1/Nmdar1* présente une exclusion anormale dans le SNC des souris DMSXL ainsi que dans les astrocytes primaires DMSXL. Ce récepteur au glutamate est localisé en densité importante au niveau de la membrane post-synaptique des neurones excitateurs. Cette zone est dite de haute densité post-synaptique (DPS) et composée de différentes protéines impliquées dans la réception et la transduction du signal glutamatergique (Kohr, 2006). GRIN1/NMDAR1 fait partie de ces protéines et suite à son activation, un courant entrant, présentant une perméabilité sélective au  $\text{Ca}^{2+}$ , dépolarise le neurone post-synaptique (Lau and Zukin, 2007 ; Wenthold et al., 2003). A plus grande échelle, ce récepteur au glutamate joue un rôle dans les mécanismes de plasticité synaptique [potentialisation à long terme (LTP) et de dépression à long terme (LTD)]. La présence de l'exon 21 serait nécessaire pour une localisation membranaire du récepteur (Ehlers et al., 1995 ; Zukin and Bennett, 1995). Il est donc envisageable que les défauts d'épissage décrits dans le cerveau des souris DMSXL affectent sa localisation cellulaire et par conséquent l'homéostasie calcique. Egalement, une dérégulation de l'épissage alternatif de l'exon 23 de *Tanc2* a été détectée dans le SNC des souris DMSXL ainsi que dans les cultures primaires d'astrocytes. Ce défaut

d'épissage a aussi été observé dans un autre modèle murin de la DM1 déficient pour *Mbnl2* (Charizanis et al., 2012). Les protéines TANC interagissent directement avec *postsynaptic density-95* (PSD-95), impliquée dans la localisation GRIN1/NMDAR1 au niveau de la synapse (Han et al., 2010). Un défaut d'épissage de *Tanc2* peut donc potentiellement altérer la localisation du récepteur GRIN1/NMDAR1.

En prenant avantage du modèle cellulaire cérébral de la DM1, la localisation subcellulaire du récepteur GRIN1/NMDAR1 a été étudiée. Il en ressort une différence dans la distribution du récepteur au glutamate, qui se concentre au niveau du compartiment nucléaire dans les cultures astrocytaires DMSXL homozygotes. Une plus profonde investigation avec un co-marquage des protéines spécifiques des structures subcellulaires pourrait élucider la localisation intracellulaire de GRIN1/NMDAR1 plus clairement, en présence des répétitions CUG toxiques.

Dans la situation non-transgénique on pourrait s'attendre à une localisation majoritairement membranaire du récepteur, mais en revanche, NMDAR1/GRIN1 montre une localisation élevée autour du noyau, dans un compartiment qui peut potentiellement être le réticulum endoplasmique. Cette localisation, a priori surprenante, peut s'expliquer. En effet, les astrocytes primaires sont cultivés en l'absence de neurones. Or, l'insertion des récepteurs NMDAR à la membrane cellulaire est régulée en fonction de l'activité synaptique (Lau and Zukin, 2007). Par conséquent, en l'absence de cet élément régulateur, les sous-unités GRIN1/NMDAR1 sont synthétisées et retenues dans le réticulum endoplasmique par la présence d'un signal de rétention au réticulum endoplasmique (RRE). Ce signal se situe dans la partie C-terminale de la protéine (Lau and Zukin, 2007 ; Scott et al., 2001 ; Scott et al., 2003). Or, l'épissage de l'exon 21, situé dans la partie C-terminale du récepteur, est dérégulé dans la DM1. Cela pourrait donc avoir des effets sur sa localisation cellulaire, sur ses interactions protéiques et son état d'activation et donc finalement influencer la concentration calcique de la cellule. Pour en savoir plus sur les conséquences d'une telle dérégulation, une mesure du flux calcique au sein des astrocytes primaires, suite à l'activation du récepteur serait nécessaire. Au moment de l'écriture de ce chapitre, ces expériences sont en cours.

Ces données suggèrent donc que la dérégulation du récepteur GRIN1/NMDAR1 ait un impact sur l'homéostasie calcique au sein entre autres, des astrocytes, ce qui peut alors impacter la communication neurone/astrocyte et donc l'activité synaptique (Lalo et al., 2006). Il est aussi envisageable de penser que l'exclusion de l'exon 21 du transcrit *GRIN1/NMDAR1* au sein d'une population neuronale ait aussi une conséquence sur la localisation cellulaire du récepteur et impacte alors certain aspect de la cognition. Il serait donc intéressant de réaliser une étude similaire sur la localisation cellulaire du récepteur GRIN1/NMDAR1 sur un

modèle neuronal de la DM1, ainsi que sur une co-culture d'astrocytes et de neurones primaires issus des souris DMSXL.

La dérégulation de l'homéostasie et flux calcique cellulaire a été confirmé par l'analyse de la réponse calcique des astrocytes primaires DMSXL à l'ATP, qui a révélé une différence significative de la concentration calcique cytosolique entre les cultures, issues d'embryons non transgéniques versus les embryons DMSXL. L'adénosine triphosphate (ATP) est un activateur des récepteurs purinergiques qui résultent en une augmentation calcique cytosolique. Il semblerait donc que la réponse calcique à l'ATP soit plus importante dans les astrocytes DMSXL, suggérant une dysfonction de la voie purinergique. Cette voie fait intervenir une famille de récepteurs transmembranaires sensibles à l'ATP, et provoque une entrée calcique intracellulaire une fois ces récepteurs activés. Par un phénomène de cascade et de messagers secondaires, cette voie peut aussi activer d'autres récepteurs situés sur les différentes organelles de la cellule (Illes et al., 1996).

Cette voie est impliquée dans de nombreux processus biologiques (Franke et al., 2012), à l'image de la transmission synaptique mais aussi de la régulation de l'activité neuronale impliquée dans le contrôle respiratoire (Erlichman et al., 2010), connu pour être dérégulé chez les patients DM1 (Groh et al., 2008 ; Reardon et al., 1993) et dans les souris DMSXL (Panaite et al., 2013). Elle est aussi impliquée dans le sommeil, la mémoire et l'apprentissage, les émotions et la motivation (Burnstock et al., 2011), autant de paramètres connus pour être affectés chez les patients DM1 (Kobayakawa et al., 2012 ; Meola et al., 2003 ; Meola and Sansone; Romigi et al., 2011). L'utilisation d'activateurs/inhibiteurs plus spécifiques de chaque membre des récepteurs purinergiques nous permettrait d'identifier de manière plus précise l'origine moléculaire de la dérégulation calcique observée.

La caractérisation d'un modèle cellulaire cérébral de la DM1 a montré que les astrocytes primaires DMSXL reproduisaient d'importantes caractéristiques de la DM1 : accumulation du transcrit *DMPK* porteurs des expansions CUG, séquestration des protéines MBNL1 et MBNL2, surexpression de CELF1 et CELF2, hyperacidification de CELF1 et défauts d'épissage de transcrits connus pour être dérégulés dans le SNC des patients DM1. De manière surprenante, les cultures primaires de neurones DMSXL n'ont pas reproduit autant de caractéristiques typiques moléculaires de la DM1. En effet, seules l'accumulation des foci et la co-localisation des protéines MBNL1 et MBNL2 ont été répertoriées dans les cultures primaires neuronales DMSXL. Il semblerait donc que cela ne soit pas suffisant pour induire des défauts d'épissage des transcrits étudiés. Plusieurs explications peuvent être avancées. Tout d'abord, l'expression du transgène *DMPK* dans les neurones primaires est beaucoup plus faible comparée aux astrocytes primaires. Il en résulte

donc une expression des répétitions CUG toxiques moins importante: suffisante pour induire l'accumulation de foci et la co-localisation de MBNL1 et MBNL2, mais pas assez pour observer une dérégulation des protéines CELF, ou des défauts d'épissage. Les signes connus de la toxicité due à l'expression des expansions CTG semblent donc être moins visibles dans la population neuronale DMSXL. Cette donnée rejoint celle du chapitre V., et argumente en faveur d'une dysfonction des cellules gliales. Une deuxième hypothèse peut suggérer que les neurones primaires en culture n'expriment pas, pour la majorité des gènes étudiés, un profil d'épissage adulte, même lorsque ils expriment des marqueurs de différenciation neuronale. En conséquence, le retour pathologique à l'âge adulte vers un profil d'épissage embryonnaire ne peut pas être observé dans ces cellules. L'ensemble de ces données positionne pour l'instant les cultures d'astrocytes primaires DMSXL comme un bon modèle cérébral de la DM1, pour étudier la toxicité de l'ARN et ses conséquences fonctionnelles, mais aussi pour tester *in vitro* l'impact de différentes drogues et stratégies thérapeutiques. Cependant, il me semble nécessaire de développer en parallèle un autre système cellulaire de neurones différenciés pour étudier l'impact des expansions CTG précisément sur les neurones. Et enfin, une étude sur un modèle cellulaire non cérébrale pourrait démontrer que la dérégulation de la voie calcique n'est pas dépendante du type cellulaire et en affecte plusieurs dans la DM1.

Les résultats de ce chapitre suggère pour la première fois une possible dérégulation calcique dans le SNC dans la DM1. La cause de cette altération de l'homéostasie calcique peut être multiple. Elle peut venir d'une altération ARNm de canaux ioniques impliqués dans la régulation de l'homéostasie calcique, d'une dérégulation de l'expression de protéines intimement liés au calcium, d'un défaut de localisation d'un récepteur impliqué dans la distribution cellulaire du calcium. Les conséquences d'une dérégulation calcique sont elles aussi très complexes et peuvent altérer de nombreuses fonctions neurologiques. Ainsi, il serait pertinent de s'attarder de manière plus approfondie et détaillée sur cet ion, afin de mieux comprendre la neuropathogenèse de la DM1.

## CHAPITRE VII.

# Validation *in vitro* d'une stratégie thérapeutique de remplacement du facteur d'épissage MBNL1 séquestré par les ARNs toxiques

### RESUME |

Depuis plusieurs années maintenant, de nombreuses stratégies thérapeutiques pour la DM1 se sont développées et ont été principalement testées au sein des muscles squelettiques de modèles murins de la maladie. Cependant, l'effet bénéfique sur le SNC de ces stratégies thérapeutiques a été peu étudié. Ainsi, l'équipe de Nicolas Sergeant (Inserm U837, Université Lille Nord de France), a créé une construction qui exprime une forme tronquée de MBNL1, MBNL1 $\Delta$ Cter, visant à libérer MBNL1 endogène séquestrée au sein des foci d'ARN. Cette construction a montré des effets bénéfiques sur l'épissage alternatif, en corrigeant les défauts d'épissage dans des modèles cellulaires DM1 musculaires. Dans l'optique d'évaluer cette approche au sein du SNC, l'action de MBNL1 $\Delta$ Cter a été étudiée dans un modèle cellulaire cérébral (cellules gliales) de la DM1. L'ensemble des résultats, présenté dans ce chapitre, montre que MBNL1 $\Delta$ Cter co-localise avec les foci d'ARN des astrocytes primaires des souris DMSXL et corrige les défauts d'épissage présentés par ces cellules. Ces résultats valident cette stratégie thérapeutique dans des astrocytes porteurs des amplifications CTG, et suggère un effet bénéfique plus général, au sein du SNC dans la DM1.

En collaboration avec Nicolas Sergeant  
Inserm U837, Université Lille Nord de France

## I. INTRODUCTION

Il est aujourd'hui prouvé que les événements moléculaires anormaux observés dans la DM1 sont en partie la conséquence de la dérégulation de deux familles de protéines régulatrices de l'épissage alternatif: la famille MBNL et la famille CELF. Ce chapitre va particulièrement s'intéresser à un membre de la famille MBNL : MBNL1.

MBNL1 fut identifiée comme capable de se lier *in vitro* aux (CUG)<sub>n</sub> (Miller et al., 2000), puis *in vivo* dans des cellules musculaires et neuronales de patients DM1 (Fardaei et al., 2001 ; Jiang et al., 2004 ; Mankodi et al., 2001). Par conséquent, la localisation de cette protéine au niveau des foci sous formes d'inclusions nucléaires entraîne sa déplétion du nucléoplasme et donc son impossibilité à réguler l'épissage alternatif de ses transcrits cibles, à l'image de la troponine cardiaque *TNNT2/cTNT* ou du récepteur à l'insuline *INSR*, dérégulés dans la DM1. Un modèle murin invalidé pour *Mbnl1* est venu confirmer les conséquences multisystémiques d'une telle déplétion, car elle entraîne des symptômes musculaires, oculaires, cardiaques et neurologiques (Kanadia et al., 2003 ; Suenaga et al., 2012).

Aujourd'hui, aucun traitement curatif n'est disponible pour la DM1. Cependant, en éteignant l'expression des ARNs toxiques porteurs des expansions CUG, au sein d'un modèle murin conditionnel de la DM1, la nature réversible des symptômes associés à la DM1 dans les muscles et le cœur a été démontrée (Mahadevan et al., 2006), ouvrant ainsi la porte au développement de thérapies. Ainsi, une des stratégies thérapeutiques étudiée par plusieurs équipes est l'élimination du transcrit toxique ARN par l'utilisation d'oligonucléotides antisens (Mulders et al., 2010 ; Sicot and Gomes-Pereira, 2013). Ces approches ont été testées avec succès dans plusieurs modèles murins exprimant les expansions CTG dans les muscles (Lee et al., 2012 ; Mulders et al., 2009 ; Wheeler et al., 2009).

Une voie thérapeutique alternative est de moduler le niveau et/ou l'activité régulatrice de l'épissage de MBNL1. En effet, la surexpression de MBNL1 médiée par transduction d'un vecteur viral, dans le modèle murin *HSA<sup>LR</sup>*, a permis de corriger certains défauts d'épissage et de supprimer la myotonie (Kanadia et al., 2006). Les effets bénéfiques de la restauration de MBNL1 ont été confirmés dans les muscles squelettiques d'un modèle murin de la DM1, à la suite du croisement de ce modèle murin *HSA<sup>LR</sup>* avec un modèle murin transgénique surexprimant MBNL1 de façon constitutive (Chamberlain and Ranum, 2012). L'ensemble de ces données confirme le potentiel rôle thérapeutique d'une surexpression de la protéine MBNL1. Cependant, l'efficacité d'une telle stratégie dans les autres tissus ou organes que ceux musculaires reste à être démontrée, notamment dans le SNC ou un rôle prédominant de l'inactivation de MBNL2 a été récemment démontré (Charizanis et al., 2012). En

effet, le rôle prédominant de MBNL2 dans l'atteinte neurologique de la DM1 soulève des questions sur les effets du remplacement de MBNL1 dans le SNC.

L'équipe de Nicolas Sargent a précédemment développé une série de constructions MBNL1 tronquées et analysé ainsi l'implication des différentes régions exoniques de MBNL1 dans sa localisation nucléaire, son activité d'épissage et sa capacité de liaison à l'ARN (Tran et al., 2011). Parmi elles, se trouve la construction nommée MBNL1 $\Delta$ Cter, isoforme tronquée de MBNL1 en C-terminal, d'une longueur de 269 acides aminés et comprenant les exons 1 à 3 ainsi que les deux motifs en doigts de zinc CCCH localisés dans l'exon 2 de MBNL1. Présents au niveau de la région N terminale, ces motifs sont nécessaires à la liaison avec l'ARN. Il a été montré que cette isoforme tronquée a une activité mineure sur la régulation de l'épissage alternatif et co-localise avec les expansions toxiques CUG. La liaison de cette protéine tronquée aux expansions d'ARN toxiques permet donc de libérer MBNL1 endogène séquestrée, qui peut alors épisser correctement ses transcrits cibles. Par conséquent, l'expression de MBNL1 $\Delta$ Cter a restauré l'épissage de *Tau* exogène, exprimé par un minigène, dans les cellules HeLa transfectées avec des répétitions CTG, ainsi que l'épissage d'autres transcrits dérégulés, à l'image de *Bin1* ou *Zasp* dans des myoblastes de patients DM1 (Tran et Sargent ; résultats non publiés). L'ensemble de ces données suggère le potentiel thérapeutique de cette construction particulière de MBNL1. L'analyse de l'effet de MBNL1 $\Delta$ Cter dans un contexte DM1 cérébral confirmerait sa capacité à restaurer des défauts d'épissage d'autres transcrits dérégulés dans le cerveau.

C'est ainsi que j'ai participé à la validation *in cellulo*, dans un modèle de cellules cérébrales, de la stratégie thérapeutique basée sur MBNL1 $\Delta$ Cter.

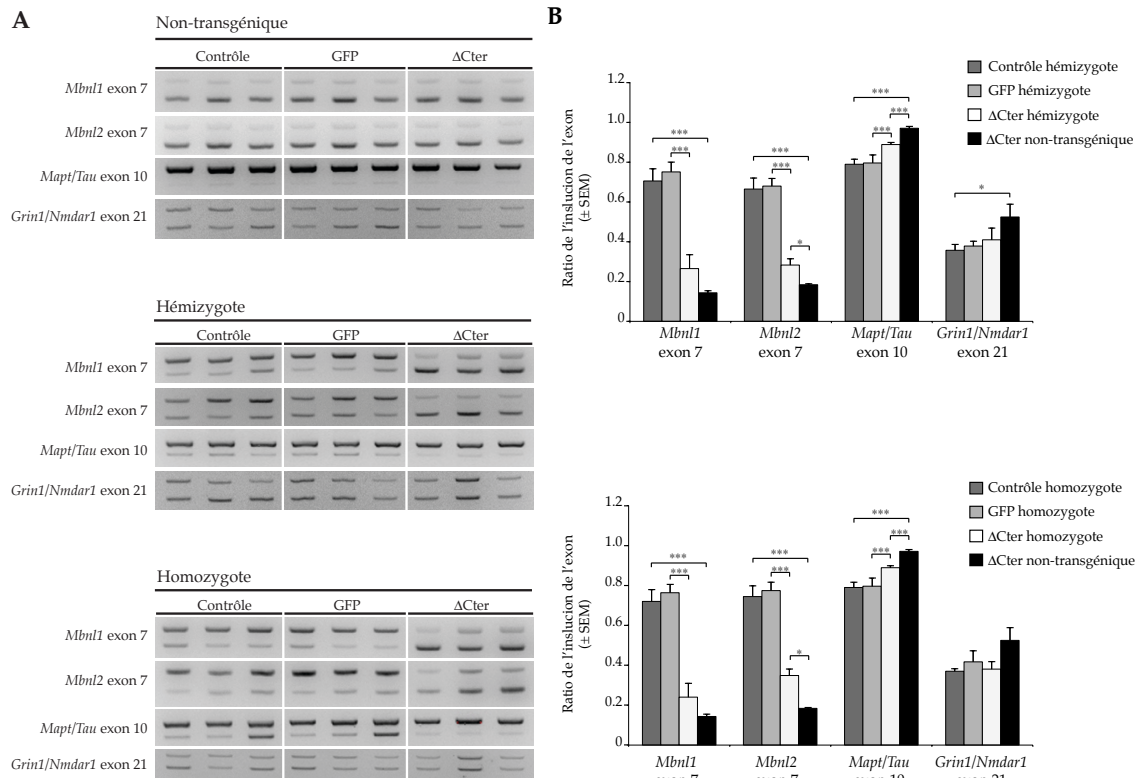
## II. RESULTATS

Afin de tester la capacité thérapeutique de MBNL1 $\Delta$ Cter dans un modèle cellulaire cérébral de la DM1, des astrocytes primaires dérivés d'embryons non-transgéniques, d'embryons DMSXL hémizygotés et homozygotés ont été utilisés après 12 jours préalable de culture. Leur caractérisation est décrite dans le chapitre VI. Ce modèle présente des foci d'ARN associés à la séquestration de MBNL1 et MBNL2, une surexpression de CELF1 et CELF2, une hyperacidification de CELF1 ainsi que la dérégulation de l'épissage alternatif de certains transcrits. Il réunit donc d'importantes caractéristiques moléculaires de la DM1 et est un bon modèle cellulaire pour tester la construction MBNL1 $\Delta$ Cter dans un contexte cérébral. Pour cette expérience, l'ARN et les protéines ont été extraits des différentes cultures (n=3 pour chaque génotype) sous différentes conditions : après infection avec un lentivirus exprimant MBNL1 $\Delta$ Cter étiquetée (*tagged* ou *taggée*) avec la GFP (GFP-MBNL1 $\Delta$ Cter), après infection avec un lentivirus exprimant la protéine GFP (GFP) (condition contrôle), ou en condition contrôle avec utilisation des produits de transduction seuls (mock).

### II.1. Restauration d'un épissage alternatif normal par MBNL1 $\Delta$ Cter

MBNL1 $\Delta$ Cter est capable de se lier aux expansions CUG et de restaurer l'épissage alternatif de transcrits dans des myoblastes de patients DM1 et des cellules HeLa transfectées avec les expansions CTG. Ainsi, en jouant un rôle de compétiteur avec MBNL1 endogène pour la liaison aux expansions CUG, il est intéressant de vérifier si MBNL1 $\Delta$ Cter, par la libération de MBNL1 endogène, a la capacité de restaurer un profil d'épissage normal pour des transcrits dérégulés dans les populations astrocytaires dérivées d'embryons DMSXL. Pour cela, le profil d'épissage alternatif de transcrits, pertinents pour la physiopathologie de la DM1 et connus pour être dérégulés de manière consistante dans le SNC dans la DM1, a été analysé (Figure II.1.).





**Figure II.1. Analyse de l'effet de MBNL1 $\Delta$ Cter sur l'épissage alternatif de différents transcrits. (A)** Analyse par RT-PCR de l'épissage de l'exon 7 de *Mbnl1*, exon 7 de *Mbnl2*, exon 10 de *Mapt/Tau* et exon 21 de *Grin1/Nmdar1*, après infection contrôle sans virus (mock), infection avec la protéine GFP (GFP) et infection avec GFP-MBNL1 $\Delta$ Cter ( $\Delta$ Cter) de 3 populations astrocytaires dérivées d'embryons E16.5 non transgéniques (n=3), DMSXL hémizyotes (n=3) et DMSXL homozygotes (n=3). **(B)** Quantification des ratios d'inclusion des exons alternatifs des transcrits nommés ci-dessus pour les astrocytes primaires dérivés d'embryons DMSXL hémizyotes (panneau du haut) et DMSXL homozygotes (panneau du bas) après infection contrôle (mock, gris foncé), après infection avec la protéine GFP (GFP, gris), après infection avec la construction GFP-MBNL1 $\Delta$ Cter ( $\Delta$ Cter, gris clair), en comparaison avec les astrocytes primaires dérivés d'embryons non-transgéniques infectés avec la construction GFP-MBNL1 $\Delta$ Cter ( $\Delta$ Cter non-transgénique, noir). Les résultats sont présentés  $\pm$  l'erreur type sur la moyenne (\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

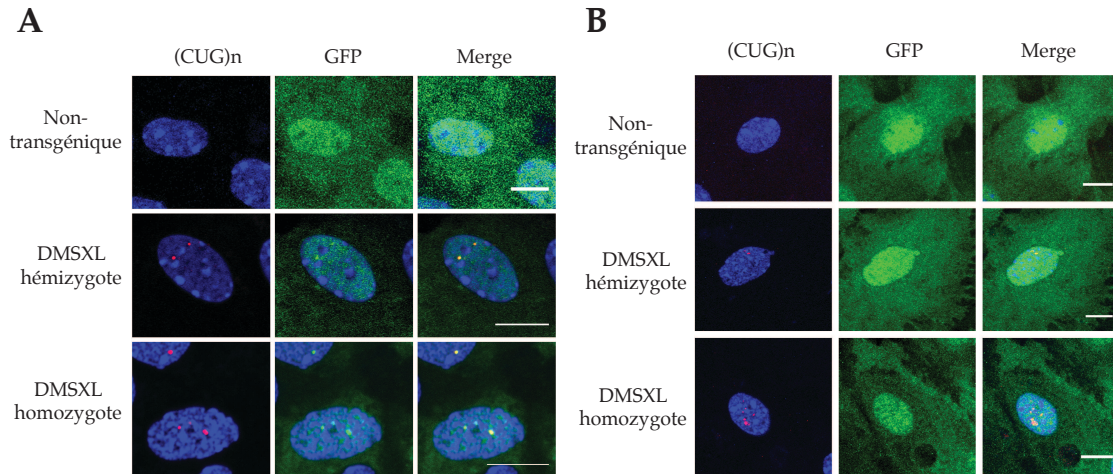
L'analyse de l'épissage alternatif de l'exon 7 des transcrits *Mbnl1* et *Mbnl2*, de l'exon 10 de *Mapt/Tau* et de l'exon 21 de *Grin1/Nmdar1* a été réalisée. Un retour significatif vers un profil d'épissage normal est observé dans les cultures astrocytaires dérivées d'embryons DMSXL hémizyotes et homozygotes suite à l'infection par MBNL1 $\Delta$ Cter, pour l'exon 7 du transcrit *Mbnl1*, l'exon 7 du transcrit *Mbnl2* et l'exon 10 du transcrit *Mapt/Tau*. En effet, le ratio de l'inclusion de l'exon 7 de *Mbnl1* et de *Mbnl2* diminue significativement de > 50% par rapport aux conditions contrôles d'infection mock ou d'infection avec la protéine GFP seule. Dans le cas de *Mbnl1*, le ratio d'inclusion de l'exon 7 suite à l'infection de MBNL1 $\Delta$ Cter n'est plus significativement différent de celui détecté dans les astrocytes primaires non-transgéniques, ce qui suggère une correction quasi-complète de ce défaut d'épissage. Même si l'expression de MBNL1 $\Delta$ Cter diminue de façon très marquée l'inclusion anormale de l'exon 7 de *Mbnl2* dans les astrocytes des

souris DMSXL hémizygotés ou homozygotés, le ratio d'inclusion reste toujours significativement supérieur (1.5 à 2 fois) à celui des astrocytes non-transgéniques contrôles. Ces résultats montrent que l'expression de la protéine MBNL1 tronquée corrige de façon significative, mais partielle le défaut d'épissage de *Mbnl2*. L'effet de MBNL1 $\Delta$ Cter sur l'inclusion anormale de l'exon 10 de *Mapt/Tau* est moins important que celui détecté sur *Mbnl1* ou *Mbnl2*. En tout cas, l'expression de la protéine tronquée induit une augmentation significative (bien que partielle) de l'inclusion de l'exon 10 alternatif, vers un profil normal de cellules non-transgéniques. Enfin, le défaut d'épissage de l'exon 21 du transcrit *Grin1/Nmdar1* dans les astrocytes DMSXL est plus variable et moins sévère que celui observé pour l'exon 7 de *Mbnl1* et *Mbnl2* ou l'exon 10 de *Mapt/Tau*. Contrairement à *Mbnl1*, *Mbnl2* et *Mapt/Tau*, l'expression de MBNL1 $\Delta$ Cter ne change pas le profil d'épissage de cet exon.

## II.2. Localisation cellulaire de GFP-MBNL1 $\Delta$ Cter

Afin de démontrer que la construction tronquée MBNL1 $\Delta$ Cter est bien capable de se lier aux expansions CUG, libérant ainsi MBNL1 endogène, la localisation cellulaire de GFP-MBNL1 $\Delta$ Cter est vérifiée par l'étiquette (*tag*) GFP présente dans la construction, et combinée avec une FISH pour la détection des foci d'ARN porteurs des expansions CUG. Les résultats sont présentés dans la Figure II.2.

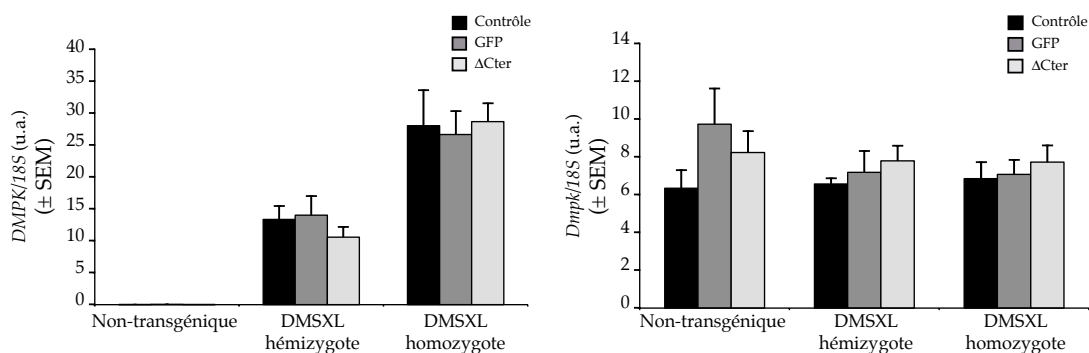
Après l'infection avec la construction GFP-MBNL1 $\Delta$ Cter, une co-localisation du signal GFP et des foci d'ARN nucléaires est détectée au sein des populations astrocytaires dérivées d'embryons DMSXL hémizygotés et DMSXL homozygotés comparée à celles dérivées d'embryons non transgéniques (Figure II.2.A.). En revanche, le signal fluorescent contrôle de la GFP a une distribution homogène dans le cytoplasme et noyau des cellules infectées (Figure II.2.B.), dans les trois populations astrocytaires (non-transgéniques, hémizygotés et homozygotés). Cela montre que la co-localisation de GFP-MBNL1 $\Delta$ Cter aux foci d'ARN est indépendante du *tag* GFP. Il semblerait donc que MBNL1 $\Delta$ Cter soit séquestrée au sein des foci par sa capacité de liaison aux répétitions d'ARN CUG. Il reste néanmoins un faible signal GFP diffus, suggérant que la totalité de la protéine GFP-MBNL1 $\Delta$ Cter n'est pas retenue au sein des foci nucléaires d'ARN.



**Figure II.2. Localisation des constructions GFP et GFP-MBNL1ΔCter dans les 3 populations astrocytaires testées.** Détection des foci nucléaires ARN toxiques (en rouge) sur une population astrocytaire dérivée d'embryons E16.5 non transgéniques, DMSXL hémizygotes et DMSXL homozygotes, préalablement infectée avec (A) la construction GFP-MBNL1ΔCter ou (B) la construction GFP. La barre d'échelle correspond à 10μm.

### II.3. Effet de MBNL1ΔCter sur l'expression de *DMPK* et *Dmpk*

Afin d'éliminer la possibilité d'un effet de l'expression de MBNL1ΔCter sur l'expression du transgène *DMPK*, qui expliquerait la restauration de l'épissage alternatif dans les astrocytes primaires DMSXL, l'expression du transgène humain *DMPK*, porteur des répétitions CTG, ainsi que l'expression de *Dmpk* endogène ont été analysées par PCR quantitative en temps réel (Figure II.3.).



**Figure II.3. Profil d'expression du transgène *DMPK* (panneau de gauche) et de *Dmpk* endogène (panneau de droite) sur les cultures primaires d'astrocytes dérivés d'embryons E16.5 non transgénique (n=3), DMSXL hémizygotes (n=3) et homozygotes (n=3), sous différentes conditions: infection mock (contrôle), infection GFP (GFP) et infection GFP-MBNL1ΔCter (ΔCter). Les résultats sont présentés ± l'erreur type sur la moyenne, rapportés au contrôle interne 18S, en unités arbitraires (u.a.).**

L'analyse des résultats ne montre aucune différence significative du niveau de l'expression du transgène *DMPK* porteur des répétitions CTG dans les différentes conditions expérimentales testées (contrôle, GFP et GFP-MBNL1 $\Delta$ Cter) sur les 3 populations astrocytaires. L'expression de *DMPK* chez les astrocytes primaires dérivés d'embryons DMSXL hémizygotés est deux fois plus faible que celle quantifiée chez les astrocytes primaires dérivés d'embryons DMSXL homozygotés. Cela s'explique par le fait qu'une seule copie du transgène est présente chez les DMSXL hémizygotés alors que deux le sont chez les DMSXL homozygotés. Les différentes infections réalisées n'affectent pas non plus le niveau d'expression de *Dmpk* endogène, qui est comparable entre les différents génotypes au sein desquels le nombre de copies ne varie pas. De plus, aucune mort cellulaire excessive n'a été observée suite à l'expression de MBNL1 $\Delta$ Cter (résultats non présentés) suggérant une faible toxicité de la construction utilisée.

### III. DISCUSSION

Les résultats présentés dans ce chapitre apportent de nouveaux arguments en faveur de l'efficacité de la stratégie thérapeutique qui propose le remplacement de la protéine MBNL1 endogène séquestrée par une forme tronquée capable de se lier aux ARNs toxiques, mais qui n'affecte pas la régulation de l'épissage alternatif. En effet, MBNL1 $\Delta$ Cter co-localise avec les foci d'ARN nucléaires dans des astrocytes primaires issus d'embryons DMSXL et restaure un profil d'épissage normal pour l'exon 7 du transcrit *Mbnl1*, l'exon 7 du transcrit *Mbnl2* et l'exon 10 du transcrit *Mapt/Tau*, connus pour être dérégulés au niveau du cerveau des patients DM1 (Hernandez-Hernandez et al., 2013b ; Jiang et al., 2004). Cela suggère donc que l'occupation du site de liaison des expansions CUG par MBNL1 $\Delta$ Cter libère la protéine MBNL1 endogène, restaurant ainsi son expression et entre autres sa fonction régulatrice de l'épissage alternatif, pas seulement dans les myoblastes (Tran et Sergeant *et al.*, résultats non publiés) mais aussi dans des cellules cérébrales, comme les astrocytes. L'absence d'effet de MBNL1 $\Delta$ Cter sur le profil d'épissage de *Grin1/Nmdar1* pourrait être expliquée par le fait que l'épissage alternatif de l'exon 21 est plutôt régulé par des protéines de la famille CELF ou NOVA (Chen and Manley, 2009 ; Zhang et al., 2002).

D'autres équipes ont également démontré les effets bénéfiques d'une surexpression de MBNL1, mais uniquement dans les muscles squelettiques du modèle murin *HSA*<sup>LR</sup> de la DM1, qui surexprime des CUG toxiques au niveau musculaire. Différentes stratégies ont été utilisées pour garantir la surexpression de MBNL1, comme l'infection virale par injection directe dans le muscle de ces souris (Kanadia et al., 2006), ou le croisement des souris *HSA*<sup>LR</sup> avec un modèle surexprimant MBNL1 de façon constitutive sur la régulation du promoteur de la  $\beta$ -actine et l'activateur (*enhancer*) CMV (Chamberlain and Ranum, 2012). La création de ce modèle murin surexprimant MBNL1 dans de multiples organes nous renseigne sur la toxicité d'une telle stratégie. La surexpression de MBNL1 est compatible avec la vie et n'induit pas de létalité embryonnaire. De manière similaire, aucuns signes de mort cellulaire ou de stress cellulaire dans les astrocytes DMSXL infectés avec la protéine tronquée MBNL1 $\Delta$ Cter n'ont été détectés. En conclusion, la toxicité et les effets secondaires dus à une surexpression de MBNL1 sont donc limités, ce qui renforce le potentiel thérapeutique de cette protéine.

Comme expliqué ci-dessus, l'expression de MBNL1 $\Delta$ Cter permettrait de bloquer l'accès de MBNL1 endogène aux sites de liaisons CUG. Plusieurs études, visant également à bloquer cet accès, par des approches pharmacologiques ou en

utilisant des oligonucléotides antisens, ont démontré l'efficacité de cette stratégie dans des modèles animaux de la DM1 (Garcia-Lopez et al., 2011 ; Leger et al., 2013 ; Warf et al., 2009 ; Wheeler et al., 2009). Dans l'étude réalisée dans ce chapitre, seul l'effet délétère de la perte de fonction de MBNL1 dans la DM1 est analysé. L'impact sur le SNC de la séquestration de MBNL1 par les foci d'ARN a été démontré par la génération d'un modèle murin déficient pour le gène *Mbnl1*. Ce modèle présente entre autres une apathie et un manque de motivation, et des défauts d'épissage légers dans le cerveau (Suenaga et al., 2012). Un modèle murin déficient pour *Mbnl2* présente des anomalies neurologiques plus importantes, notamment des troubles du sommeil, déficits cognitifs et transmission synaptique altérée, associées à des défauts plus marqués de l'épissage alternatif de transcrits exprimés dans le cerveau, (Charizanis et al., 2012). La comparaison entre ces deux modèles animaux suggère un fort impact sur le SNC de la séquestration de MBNL2 par les foci d'ARN. Vu que les sites de liaison de MBNL1 et MBNL2 partagent la même séquence (YG<sub>n</sub>CY, où Y représente une base pyrimidique) (Charizanis et al., 2012 ; Ho et al., 2004), il serait donc intéressant dans un premier temps d'évaluer si l'expression de MBNL1ΔCter libère aussi la protéine MBNL2 endogène présente dans les foci d'ARN. Il est possible que MBNL1 et MBNL2 soient capables de se lier aux mêmes sites sur l'ARN, et donc que la surexpression de MBNL1ΔCter corrige (au moins une partie) des défauts d'épissage qui résultent spécifiquement de la perte de fonction de MBNL2. Dans un deuxième temps, on pourra envisager une stratégie thérapeutique alternative en utilisant une construction tronquée de MBNL2, similaire à celle utilisée pour MBNL1. Il serait intéressant d'évaluer l'impact d'une telle forme tronquée sur l'épissage alternatif dans des modèles cellulaires cérébraux de la DM1 et de comparer son efficacité avec celle de la construction MBNL1ΔCter.

En plus de MBNL1 et MBNL2, le transcrit *DMPK*, contenant les expansions, séquestre d'autres protéines à l'image de SP1 et de RAR $\gamma$  dans des myocytes DM1 (Ebralidze et al., 2004). Il serait pertinent de vérifier si la liaison de MBNL1ΔCter au motif CUG des expansions a aussi un effet libérateur sur d'autres facteurs, disponible alors pour exercer leur fonction, par une approche transcriptomique globale comme réalisée dans de précédentes études (Wheeler et al., 2009).

Enfin, l'ensemble de ces données confirme l'effet bénéfique de MBNL1ΔCter sur le profil d'épissage de transcrits dérégulés dans un modèle de cellules gliales de la DM1. Cette stratégie thérapeutique adoptée semble donc être efficace non seulement dans un contexte musculaire, mais aussi dans un contexte cérébral. La construction MBNL1ΔCter est donc très prometteuse pour cibler non seulement les muscles mais aussi le SNC. Il reste donc à savoir si la correction des défauts

d'épissage médiée par MBNL1 $\Delta$ Cter se traduit par une amélioration des symptômes au niveau des muscles et du SNC. Le modèle murin DMSXL, présentant à la fois un phénotype musculaire et neurologique, serait idéal pour tester l'effet bénéfique de MBNL1 $\Delta$ Cter à l'échelle de la souris. Les souris DMSXL homozygotes présentent entre autre une apathie et une faiblesse musculaire plus importantes que les souris contrôles, deux paramètres robustes dont l'évaluation serait un bon indicateur de l'efficacité de la stratégie thérapeutique à la fois sur les muscles et le SNC.

## **CHAPITRE VIII.**

### **Conclusion générale**



Mes travaux de thèse ont permis d'avancer dans la compréhension du mécanisme neuropathologique de la DM1 en mettant en lumière la dérégulation de régions cérébrales, de circuits neuronaux et de voies métaboliques encore peu impliqués jusqu'à présent dans la DM1 (Figure I.). Tous ces travaux ont été permis grâce à l'utilisation de différents modèles murins de la DM1, notamment celui généré au sein du laboratoire, les souris DMSXL.

## I. LE MODELE ANIMAL

Les souris DMSXL ont été utilisées pour ces travaux comme modèle animal de la DM1. Ces souris transgéniques, porteuses d'un large fragment de 45 kb d'ADN génomique humain dérivé du locus DM1 humain (Gourdon et al., 1997 ; Seznec et al., 2001), miment un certain nombre de caractéristiques de la DM1, à l'image de l'instabilité somatique et intergénérationnelle, toutes deux biaisées vers les expansions (Lia et al., 1998 ; Seznec et al., 2000). Ainsi, les souris DMSXL portent aujourd'hui plus de 1000 répétitions CTG (Gomes-Pereira et al., 2007). C'est le seul modèle murin de la DM1 à, d'une part exprimer dans son contexte génomique humain les expansions CTG, et d'autre part à reproduire l'instabilité si caractéristique de la DM1. Mais ce ne sont pas ces seuls avantages.

En effet, grâce au contexte génomique du transgène, ce modèle est aussi le seul à exprimer les transcrits *DMPK* porteurs des expansions CTG dans de nombreux tissus et à reproduire un phénotype multisystémique, autre caractéristique de la DM1. Pour l'étude de la neuropathogenèse de la DM1, ce modèle est donc le seul à exprimer les expansions CTG dans le SNC et à développer des phénotypes qui se rapprochent des symptômes observés chez les patients DM1. Les souris DMSXL ont en effet montré certaines anomalies de comportement semblables à celles détectées chez les patients DM1. Elles ont montré une baisse de l'activité exploratrice associée à une anxiété augmentée. De plus, elles présentent une altération de la mémoire spatiale, comparable à ce qui est observé chez les patients DM1. Enfin, l'anhédonie préalablement décrite chez les patients DM1, a aussi été détectée chez les souris DMSXL (Hernandez-Hernandez et al., 2013a). Des anomalies électrophysiologiques ont également été observées au sein de l'hippocampe des souris DMSXL, région présentant une accumulation élevée de foci d'ARN et des défauts d'épissage. Un déficit de la plasticité synaptique à court terme a été détecté dans les souris DMSXL et est associée à la surexpression de RAB3A et l'hyperphosphorylation de la Synapsin 1 (Hernandez-Hernandez et al., 2013a). Ces résultats apportent la preuve que l'expression du transgène *DMPK* contenant les expansions CTG, conduisant à

l'accumulation toxique nucléaire de l'ARN, a des effets délétères au niveau du SNC.

Ainsi, les souris DMSXL, en reproduisant l'instabilité des expansions et un phénotype multisystémique comme observé chez les patients, sont un excellent outils, unique en son genre, pour étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires de la pathologie (cf Chapitres IV, V et VI) mais aussi pour développer et tester des stratégies thérapeutiques (cf Chapitre VII).

## II. LE MECANISME DE LA MALADIE

D'un point de vue moléculaire, les souris DMSXL expriment les foci d'ARN toxiques dans plusieurs régions cérébrales associés à une splicéopathie plus ou moins prononcée selon les régions du cerveau étudiées. Ainsi, à l'image du muscle ou du cœur, un des signes de la toxicité ARN au sein du SNC se traduit par la présence de défauts d'épissage, qui correspondent, dans la majorité des cas, à l'expression anormale des isoformes embryonnaires (cf Chapitre IV). L'étude de l'épissage alternatif de différentes régions du cerveau a révélé la nature variable et modeste de ces défauts. Cela peut s'expliquer par une expression faible du transgène, et donc des expansions, pour provoquer de sévères altérations de l'épissage. Il serait donc intéressant de générer un modèle murin complémentaire en introduisant de très larges expansions CTG au sein du gène *Dmpk*, dans un contexte génomique murin. Il est possible que ce dernier exprime de manière plus importante les expansions CTG sous son promoteur murin originel. Un tel modèle *knock-in* existe déjà (van Den Broek et al., 2002) mais les souris portent des amplifications longues de ~200 CTG, qui ne sont peut être pas suffisantes pour induire un phénotype marqué dans cette lignée. Une alternative serait aussi de générer un modèle conditionnel porteur des répétitions CTG amplifiées pures, sous le contrôle d'un fort promoteur, comme le promoteur CMV. Cela nous permettrait d'exprimer les amplifications de façon inductible dans le SNC, et même dans certaines populations neuronales ou astrocytaires spécifiques. Un modèle de ce genre, exprimant 960 répétitions CTG a été développé, mais il porte des amplifications interrompues (Orengo et al., 2008 ; Wang et al., 2007). Or, on sait aujourd'hui que les interruptions de séquences répétées peuvent altérer l'impact phénotypique de la mutation (Braida et al., 2010 ; Musova et al., 2009). L'idéal serait donc d'utiliser une séquence CTG pure afin de recréer la mutation de la DM1.

Il n'en reste pas moins qu'une analyse globale de l'expression des transcrits dans les différentes régions du cerveau montrant une accumulation des foci, en comparaison avec d'autres modèles murins complémentaires, comme ceux déficients

pour *Mbnl1* et *Mbnl2*, serait utile pour identifier de nouveaux événements moléculaires anormaux, ainsi que les mécanismes derrière ces anomalies moléculaires.

### III. UNE NOUVELLE REGION CEREBRALE SUR LA CARTE DE LA DM1

La caractérisation phénotypique des souris DMSXL m'a permise, d'une part de mettre en évidence, pour la première fois, une région insoupçonnée jusqu'alors pour être impliquée dans le mécanisme neuropathologique de la DM1, le cervelet, et d'autre part d'identifier une population cellulaire précise et une voie métabolique particulièrement sensible à la toxicité des expansions CTG.

Les résultats décrits dans le Chapitre V suggèrent une dérégulation du métabolisme du glutamate, particulièrement due à la perte de l'expression d'un transporteur du glutamate exprimé par la populations gliale. Il semblerait donc que cette population cellulaire soit affectée par l'accumulation nucléaire du transcrit *DMPK* porteur des expansions CTG. Cela a été confirmé par l'importante accumulation des foci d'ARN dans les cellules de la glie de Bergman au sein du cervelet, mais aussi dans les autres régions du cerveau (Hernandez-Hernandez et al., 2013a). De plus, il semblerait que cette accumulation préférentielle des foci d'ARN dans la population gliale soit associée à la présence de défauts d'épissage plus prononcée, à l'image de l'étude de l'épissage alternatif dans des astrocytes primaires en comparaison avec des neurones primaires DMSXL. La forte expression du transgène dans la population primaire astrocytaire miment peut être une réalité pathologique *in vivo*, responsable de la susceptibilité de cette population cellulaire particulière aux expansions CTG. Il serait intéressant de poursuivre par l'étude *in vivo* de l'épissage alternatif des astrocytes versus des neurones microdisséquées dans le cerveau des souris DMSXL mais aussi des patients DM1, dans plusieurs régions du cerveau (notamment le cortex frontal, le tronc cérébral et l'hippocampe).

L'atteinte de cette population gliale limitée, qui expliquerait la modestie des défauts d'épissage observés à l'échelle du cervelet, semble néanmoins avoir des conséquences physiologiques sur le cervelet. Cela pose la question de savoir si la DM1 est une pathologie astrocytaire et si elle est plus astrocytaire que neuronale. L'impact neuronal de la dérégulation de la population gliale de Bergman du cervelet a déjà été observé dans la pathologie neurodégénérative de SCA7 (Custer et al., 2006). D'autres pathologies, avec une dérégulation de la population gliale, comme dans le syndrome du X fragile, FXTAS et la maladie de Huntington présentent aussi

des altérations neurologiques (Cao et al., 2013 ; Forman et al., 2005 ; Higashimori et al., 2013 ; Shin et al., 2005).

#### IV. DEREGULATION DU METABOLISME DU GLUTAMATE

La dérégulation de la glie de Bergman du cervelet dans la DM1 semble être plus orientée vers une dérégulation du métabolisme du glutamate, un neurotransmetteur important du SNC. Cela rejoint les anomalies de la transmission synaptique déjà évoquées dans la DM1 (Hernandez-Hernandez et al., 2013a). En effet, la dérégulation de RAB3A et de SYN1, impliquée dans la transmission synaptique, a été rapportée dans le cerveau des souris DMSXL et des patients DM1. De plus, des défauts du dosage des neurotransmetteurs totaux dans le cerveau des souris DMSXL ont été décrits. Une atteinte synaptique semble donc réelle et résulte de plusieurs événements moléculaires dans la maladie, pouvant toucher différents circuits neuronaux à l'image de ceux dopaminergiques, sérotoninergiques ou glutamatergiques.

D'autres pathologies neurologiques et/ou à amplification de triplets répétés montrent aussi une dérégulation du métabolisme du glutamate, à l'origine d'une dysfonction de la population neuronale comme la maladie de Huntington (Shin et al., 2005), FXTAS (Cao et al., 2013) ou SCA7 (Custer et al., 2006). Ainsi, de plus en plus d'exemples pointent le glutamate comme modificateur de plusieurs pathologies neurologiques. Il serait donc intéressant de poursuivre dans l'étude de l'impact de ce neurotransmetteur sur le fonctionnement des neurones dans la DM1.

#### V. LE CALCIUM DANS LA DM1

Un autre élément potentiellement dérégulé dans le SNC dans la DM1 est l'homéostasie calcique. Sa dérégulation peut être soit un effet direct des défauts d'épissage des transcrits impliqués dans le métabolisme calcique et dérégulés par les expansions CTG, soit un effet indirect de la pathologie et donc une conséquence en aval de la dérégulation d'intermédiaires dans la DM1. Il en est de même pour les changements d'expression et post-traductionnelles de protéines aussi impliqués dans l'homéostasie. Il est en effet difficile de déterminer par quel mécanisme précis ont lieu l'ensemble de ces dérégulations. Pour investir de manière plus approfondie les effets de la dérégulation calcique sur le SNC dans la DM1, l'idéal serait de pouvoir suivre les variations calciques *in vivo* par des techniques d'imagerie du type

microscopie biphotonique. Pour ce faire, l'utilisation de marqueur fluorescent nous permettrait de suivre les variations calciques sur des tranches organotypiques de différentes régions du cerveau sous différents types de stimulation. Pour aller encore plus loin, la génération d'un modèle animal exprimant un indicateur calcique et de larges expansions CTG permettrait non seulement d'étudier l'impact des expansions CTG sur les variations calciques dans le muscle, le cœur et le SNC, mais aussi de tester différentes thérapies visant à restaurer une homéostasie calcique normale (Cirillo et al., 2012 ; Direnberger et al., 2012 ; Rogers et al., 2007 ; Tian et al., 2009).

La dérégulation calcique ne semble pas être spécifique à la DM1, mais a aussi été observée dans d'autres maladies à triplets répétés (Cao et al., 2013 ; Giacomello et al., 2013 ; Suzuki et al., 2012). Une dérégulation de l'expression de transporteurs du glutamate, dont GLT1/EAAT2, a été démontrée comme pouvant modifier les oscillations calciques des astrocytes FXTAS (Cao et al., 2013), une autre maladie médiée par toxicité ARN. Cette situation est étrangement similaire à ce qui a été décrit dans mes travaux de thèse et suggère peut être un mécanisme de base et commun à plusieurs maladies à triplets répétés, menant au développement d'une dysfonction neurologique.

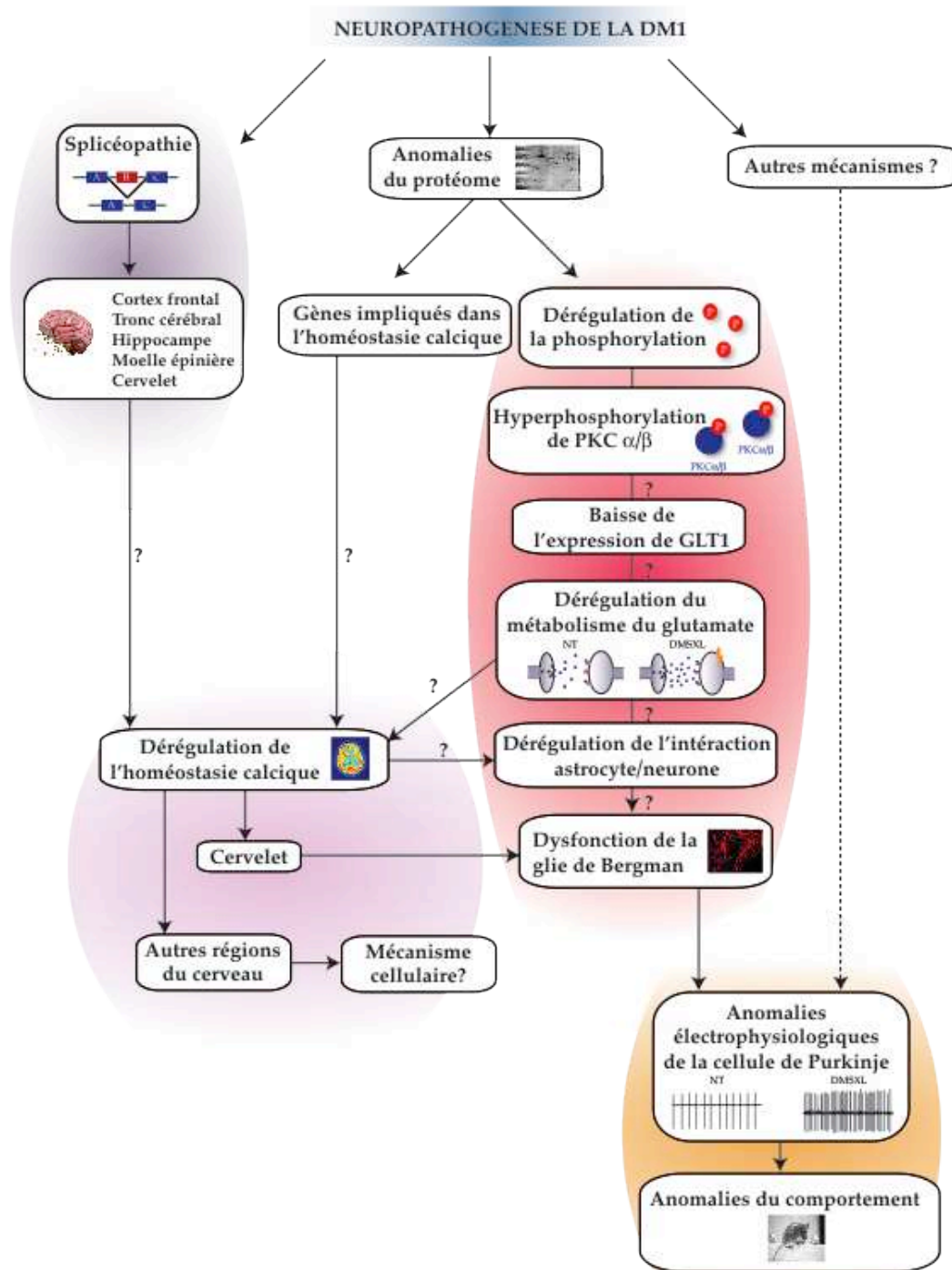
## VI. LES THERAPIES ENVISAGEABLES

Il est clairement établi maintenant que le développement des stratégies thérapeutiques pour la DM1 doit cibler aussi bien les muscles, le cœur que le SNC. Les approches de restauration du niveau d'expression des facteurs MBNL en font partie, car on sait que certains défauts d'épissage observés dans le SNC des patients DM1 sont dépendants de MBNL. Ainsi, les techniques de surexpression de MBNL dans les muscles auraient sûrement un effet bénéfique sur les atteintes neurologiques si elle était réalisée par exemple dans les souris DMSXL. L'approche MBNL1ΔCter, décrite dans le Chapitre VII, en fait partie et a déjà montré des résultats prometteurs et encourageants.

Cependant, d'autres stratégies thérapeutiques peuvent être envisagées pour le SNC et combinées avec d'autres approches plus musculaires, en attendant une méthode multisystémique neutralisant les ARNs toxiques. Dans ces travaux de thèse, deux voies métaboliques ont été montrées comme potentiellement dérégulées dans la DM1. Ainsi, une modulation du niveau du glutamate, par l'utilisation de drogues visant par exemple à restaurer l'expression du transporteur au glutamate, serait envisageable (Rothstein et al., 2005). Rétablir une homéostasie calcique normale dans

le SNC pourrait également être une possibilité pour limiter les possibles dérégulations synaptiques, impliquées dans les atteintes neurologiques.

D'autres études sont nécessaires pour déterminer avec précision l'impact de la dérégulation de l'homéostasie du calcium et du glutamate dans le SNC dans la DM1. Cela permettra par la suite de mieux comprendre le mécanisme neuropathologique non seulement de la DM1 mais aussi d'autres maladies triplets et de développer une thérapie la plus complète et efficace possible.



**Figure I. Schématisation de l'implication des résultats de mes travaux de thèse dans la neuropathogénèse de la DMI.** Une splicéopathie a été observée dans plusieurs régions cérébrales des souris DMSXL. Parmi les régions concernées, le cervelet a également montré des anomalies électrophysiologiques associées à des anomalies de comportement cervelet dépendant chez les souris DMSXL, suggérant une dysfonction des cellules de Purkinje. Suite à l'étude de la toxicité ARN, la glie de Bergman a présenté une susceptibilité importante à cette toxicité et une baisse de l'expression d'un transporteur glial du glutamate a été observé dans le cervelet, le cortex frontal et le tronc cérébral des souris DMSXL, mais aussi des patients DMI. Ce défaut protéique a été associé à une hyperphosphorylation de PKC  $\alpha/\beta$  dans le cervelet des souris DMSXL. Enfin, la splicéopathie dans le SNC a permis de mettre en évidence la dérégulation de plusieurs transcrits impliqués dans le métabolisme du calcium et ce dans le cortex frontal, le tronc cérébral et le cervelet des souris DMSXL. La possible dérégulation du métabolisme du calcium et du glutamate peut altérer la fonction gliale mais aussi entraîner une neurodysfonction des cellules de Purkinje mais également de la population neuronale en général, pouvant être impliquée dans les anomalies synaptiques et de comportement observées dans le SNC des souris DMSXL.

## **CHAPITRE IX.**

### **Bibliographie**



- Angeard, N., et al., 2007. Cognitive profile in childhood myotonic dystrophy type 1: is there a global impairment? *Neuromuscul Disord.* 17, 451-8.
- Angeard, N., et al., 2011. A new window on neurocognitive dysfunction in the childhood form of myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Neuromuscul Disord.* 21, 468-76.
- Andrade, A., et al., 2007. Myotonic dystrophy CTG repeat expansion alters Ca<sup>2+</sup> channel functional expression in PC12 cells. *FEBS Lett.* 581, 4430-8.
- Anvret, M., et al., 1993. Larger expansions of the CTG repeat in muscle compared to lymphocytes from patients with myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2, 1397-400.
- Arocena, D.G., et al., 2005. Induction of inclusion formation and disruption of lamin A/C structure by premutation CGG-repeat RNA in human cultured neural cells. *Hum Mol Genet.* 14, 3661-71.
- Artero, R., et al., 1998. The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2. *Dev Biol.* 195, 131-43.
- Ash, P.E., et al., 2013. Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron.* 77, 639-46.
- Ashizawa, T., Dubel, J.R., Harati, Y., 1993. Somatic instability of CTG repeat in myotonic dystrophy. *Neurology.* 43, 2674-8.
- Ashizawa, T., Sarkar, P.S., 2011. Myotonic dystrophy types 1 and 2. *Handb Clin Neurol.* 101, 193-237.
- Barreau, C., et al., 2006. Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions. *Biochimie.* 88, 515-25.
- Begemann, G., et al., 1997. muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development.* 124, 4321-31.
- Bellamy, T.C., 2006. Interactions between Purkinje neurones and Bergmann glia. *Cerebellum.* 5, 116-26.
- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D., 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1, 11-21.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 517-29.
- Berul, C.I., et al., 1999. DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *J Clin Invest.* 103, R1-7.
- Botta, A., et al., 2007. Gene expression analysis in myotonic dystrophy: indications for a common molecular pathogenic pathway in DM1 and DM2. *Gene Expr.* 13, 339-51.
- Braida, C., et al., 2010. Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational dynamics and likely contribute toward unusual symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum Mol Genet.* 19, 1399-412.
- Brock, G.J., Anderson, N.H., Monckton, D.G., 1999. Cis-acting modifiers of expanded CAG/CTG triplet repeat expandability: associations with flanking GC content and proximity to CpG islands. *Hum Mol Genet.* 8, 1061-7.

- Brook, J.D., 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, 385.
- Brouwer, J.R., Willemsen, R., Oostra, B.A., 2008. The FMR1 gene and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 782-98
- Brunner, H.G., et al., 1993. Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele size on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM). *Am J Hum Genet*. 53, 1016-23.
- Buj-Bello, A., et al., 2002. Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells. *Hum Mol Genet*. 11, 2297-307.
- Burnstock, G., et al., 2011. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog Neurobiol*. 95, 229-74.
- Buzsaki, G., Moser, E.I., 2013. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci*. 16, 130-8.
- Cajal, R.y., 1911. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. A. Maloine, Paris.
- Cao, Z., et al., 2013. Enhanced asynchronous Ca(2+) oscillations associated with impaired glutamate transport in cortical astrocytes expressing Fmr1 gene premutation expansion. *J Biol Chem*. 288, 13831-41.
- Chamberlain, C.M., Ranum, L.P., 2012. Mouse model of muscleblind-like 1 overexpression: skeletal muscle effects and therapeutic promise. *Hum Mol Genet*. 21, 4645-54.
- Charizanis, K., et al., 2012. Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron*. 75, 437-50.
- Charlet, B.N., et al., 2002. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell*. 10, 45-53.
- Chen, M., Manley, J.L., 2009. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10, 741-54.
- Chen, S.H., Desmond, J.E., 2005. Temporal dynamics of cerebro-cerebellar network recruitment during a cognitive task. *Neuropsychologia*. 43, 1227-37.
- Cho, D.H., et al., 2005. Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF. *Mol Cell*. 20, 483-9.
- Cirillo, G., De Luca, D., Papa, M., 2012. Calcium imaging of living astrocytes in the mouse spinal cord following sensory stimulation. *Neural Plast*. 2012, 425818.
- Claassen, D.A., Lahue, R.S., 2007. Expansions of CAG.CTG repeats in immortalized human astrocytes. *Hum Mol Genet*. 16, 3088-96.
- Clapham, D.E., 2007. Calcium signaling. *Cell*. 131, 1047-58.
- Clark, H.B., et al., 1997. Purkinje cell expression of a mutant allele of SCA1 in transgenic mice leads to disparate effects on motor behaviors, followed by a progressive cerebellar dysfunction and histological alterations. *J Neurosci*. 17, 7385-95.
- Cleary, J.D., Pearson, C.E., 2003. The contribution of cis-elements to disease-associated repeat instability: clinical and experimental evidence. *Cytogenet Genome Res*. 100, 25-55.

- Custer, S.K., et al., 2006. Bergman glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. *Nat Neurosci.* 9, 1302-11.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 65, 1-105.
- Daughters, R.S., et al., 2009. RNA gain-of-function in spinocerebellar ataxia type 8. *PLoS Genet.* 5, e1000600.
- Davis, B.M., 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, 7388-93.
- Day, J.W., et al., 2000. Spinocerebellar ataxia type 8: clinical features in a large family. *Neurology.* 55, 649-57.
- de Haro, M., et al., 2006. MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet.* 15, 2138-45.
- de Haro, M., et al., 2013. Smaug/SAMD4A restores translational activity of CUGBP1 and suppresses CUG-induced myopathy. *PLoS Genet.* 9, e1003445.
- de Leon, M.B., Cisneros, B., 2008. Myotonic dystrophy 1 in the nervous system: from the clinic to molecular mechanisms. *J Neurosci Res.* 86, 18-26.
- Denis, J.A., et al., 2013. mTOR-dependent proliferation defect in human ES-derived neural stem cells affected by myotonic dystrophy type 1. *J Cell Sci.* 126, 1763-72.
- Dhaenens, C.M., et al., 2011. Mis-splicing of Tau exon 10 in myotonic dystrophy type 1 is reproduced by overexpression of CELF2 but not by MBNL1 silencing. *Biochim Biophys Acta.* 1812, 732-42.
- Direnberger, S., et al., 2012. Biocompatibility of a genetically encoded calcium indicator in a transgenic mouse model. *Nat Commun.* 3, 1031.
- Ebralidze, A., et al., 2004. RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science.* 303, 383-7.
- Eccles, I., Szentágothai, 1967. *The cerebellum as a neuronal machine.* Springer-Verlag.
- Ehlers, M.D., Tingley, W.G., Haganir, R.L., 1995. Regulated subcellular distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor. *Science.* 269, 1734-7.
- Ekstrom, A.B., et al., 2008. Autism spectrum conditions in myotonic dystrophy type 1: a study on 57 individuals with congenital and childhood forms. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 147B, 918-26.
- Erlichman, J.S., Leiter, J.C., Gourine, A.V., 2010. ATP, glia and central respiratory control. *Respir Physiol Neurobiol.* 173, 305-11.
- Faghihi, M.A., Wahlestedt, C., 2009. Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10, 637-43.
- Fardaei, M., et al., 2001. In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Res.* 29, 2766-71.
- Fardaei, M., et al., 2002. Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet.* 11, 805-14.

- Foiry, L., et al., 2006. Msh3 is a limiting factor in the formation of intergenerational CTG expansions in DM1 transgenic mice. *Hum Genet.* 119, 520-6.
- Forman, M.S., et al., 2005. Transgenic mouse model of tau pathology in astrocytes leading to nervous system degeneration. *J Neurosci.* 25, 3539-50.
- Franc, D.T., et al., 2012. Cerebral and muscle MRI abnormalities in myotonic dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 22, 483-91.
- Francois, V., et al., 2011. Selective silencing of mutated mRNAs in DM1 by using modified hU7-snrRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 18, 85-7.
- Franke, H., et al., 2012. Pathophysiology of astroglial purinergic signalling. *Purinergic Signal.* 8, 629-57.
- Fu, Y.H., et al., 1991. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell.* 67, 1047-58.
- Fu, Y.H., et al., 1992. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science.* 255, 1256-8.
- Fu, Y.H., et al., 1993. Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science.* 260, 235-8.
- Fugier, C., et al., 2011. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med.* 17, 720-5.
- Furling, D., et al., 2001. Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet.* 10, 2079-87.
- Furling, D., et al., 2003. Viral vector producing antisense RNA restores myotonic dystrophy myoblast functions. *Gene Ther.* 10, 795-802.
- Gagnon, C., et al., 2010. Health supervision and anticipatory guidance in adult myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord.* 20, 847-51.
- Gambardella, S., et al., 2010. Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients. *J Transl Med.* 8, 48.
- Garcia-Lopez, A., et al., 2008. Genetic and Chemical Modifiers of a CUG Toxicity Model in *Drosophila*. *PLoS ONE.* 3, e1595.
- Garcia-Lopez, A., et al., 2011. In vivo discovery of a peptide that prevents CUG-RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 11866-71.
- Garcia-Tardon, N., et al., 2012. Protein kinase C (PKC)-promoted endocytosis of glutamate transporter GLT-1 requires ubiquitin ligase Nedd4-2-dependent ubiquitination but not phosphorylation. *J Biol Chem.* 287, 19177-87.
- Gatchel, J.R., Zoghbi, H.Y., 2005. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet.* 6, 743-55.
- Gaul, C., et al., 2006. Subtle cognitive dysfunction in adult onset myotonic dystrophy type 1 (DM1) and type 2 (DM2). *Neurology.* 67, 350-2.
- Gerke, V., Creutz, C.E., Moss, S.E., 2005. Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6, 449-61.

- Giacomello, M., et al., 2013. Neuronal Ca(2+) dyshomeostasis in Huntington disease. *Prion*. 7, 76-84.
- Giubilei, F., et al., 1999. Excessive daytime sleepiness in myotonic dystrophy. *J Neurol Sci*. 164, 60-3.
- Glickstein, M., Strata, P., Voogd, J., 2009. Cerebellum: history. *Neuroscience*. 162, 549-59.
- Glickstein, M., Sultan, F., Voogd, J., 2011. Functional localization in the cerebellum. *Cortex*. 47, 59-80.
- Glickstein, V.a., 1998. *Trends in Cognitive Sciences*. Vol. 2, pp. 307-313.
- Goffinet, A., 1994. *Anatomie clinique du système nerveux central*. PU Namur.
- Gomes-Pereira, M., et al., 2004. Pms2 is a genetic enhancer of trinucleotide CAG/CTG repeat somatic mosaicism: implications for the mechanism of triplet repeat expansion. *Hum Mol Genet*. 13, 1815-1825.
- Gomes-Pereira, M., Monckton, D.G., 2006. Chemical modifiers of unstable expanded simple sequence repeats: what goes up, could come down. *Mutat Res*. 598, 15-34.
- Gomes-Pereira, M., et al., 2007. CTG trinucleotide repeat "big jumps": large expansions, small mice. *PLoS Genet*. 3, e52.
- Gourdon, G., et al., 1997. Moderate intergenerational and somatic instability of a 55-CTG repeat in transgenic mice. *Nat Genet*. 15, 190-2.
- Greco, C.M., et al., 2002. Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers. *Brain*. 125, 1760-71.
- Groenen, P., Wieriga, B., 1998. Expanding complexity in myotonic dystrophy. *BioEssays*. 20, 901-912.
- Groenen, P.J., et al., 2000. Constitutive and regulated modes of splicing produce six major myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) isoforms with distinct properties. *Hum Mol Genet*. 9, 605-16.
- Groh, W.J., et al., 2008. Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type 1. *N Engl J Med*. 358, 2688-97.
- Guiraud-Dogan, C., et al., 2007. DM1 CTG expansions affect insulin receptor isoforms expression in various tissues of transgenic mice. *Biochim Biophys Acta*. 1772, 1183-91.
- Han, S., et al., 2010. Regulation of dendritic spines, spatial memory, and embryonic development by the TANC family of PSD-95-interacting proteins. *J Neurosci*. 30, 15102-12.
- Hao, M., et al., 2008. Muscleblind-like 2 (Mbnl2) -deficient mice as a model for myotonic dystrophy. *Dev Dyn*. 237, 403-10.
- Harley, H.G., et al., 1992. Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature*. 355, 545-6.
- Harper, P.S., et al., 1992. Anticipation in myotonic dystrophy: new light on an old problem. *Am J Hum Genet*. 51, 10-6.
- Harper, P.S., 1998. Myotonic Dystrophy as a Trinucleotide Repeat Disorder - A Clinical Perspective. In: *Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases*. Vol., R.D. Wells, S.T. Warren, ed.^eds. Academic Press, San Diego, pp. 115-130.

- Harper, P.S., 2001. *Myotonic Dystrophy*, Vol., WB Saunders.
- Herman, M.A., Jahr, C.E., 2007. Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *J Neurosci.* 27, 9736-41.
- Hernandez-Hernandez, O., et al., 2006. Myotonic dystrophy expanded CUG repeats disturb the expression and phosphorylation of tau in PC12 cells. *J Neurosci Res.* 84, 841-51.
- Hernandez-Hernandez, O., et al., 2013a. Myotonic dystrophy CTG expansion affects synaptic vesicle proteins, neurotransmission and mouse behaviour. *Brain.* 136, 957-70.
- Hernandez-Hernandez, O., et al., 2013b. Synaptic protein dysregulation in myotonic dystrophy type 1: disease neuropathogenesis beyond missplicing. *Rare diseases (in press)*.
- Higashimori, H., et al., 2013. Astroglial FMRP-dependent translational down-regulation of mGluR5 underlies glutamate transporter GLT1 dysregulation in the fragile X mouse. *Hum Mol Genet.* 22, 2041-54.
- Ho, T.H., et al., 2004. Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *Embo J.* 23, 3103-12.
- Ho, T.H., et al., 2005. Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing misregulation observed in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet.* 14, 1539-47.
- Holmes, S.E., et al., 2001. SCA12: an unusual mutation leads to an unusual spinocerebellar ataxia. *Brain Res Bull.* 56, 397-403.
- Holmes, S.E., O'Hearn, E., Margolis, R.L., 2003. Why is SCA12 different from other SCAs? *Cytogenet Genome Res.* 100, 189-97.
- Hubert, L., Jr., et al., 2011. Xpa deficiency reduces CAG trinucleotide repeat instability in neuronal tissues in a mouse model of SCA1. *Hum Mol Genet.* 20, 4822-30.
- Huguet, A., et al., 2012. Molecular, physiological, and motor performance defects in DMSXL mice carrying >1,000 CTG repeats from the human DM1 locus. *PLoS Genet.* 8, e1003043.
- Ikeda, Y., Daughters, R.S., Ranum, L.P., 2008. Bidirectional expression of the SCA8 expansion mutation: one mutation, two genes. *Cerebellum.* 7, 150-8.
- Illes, P., Nieber, K., Norenberg, W., 1996. Electrophysiological effects of ATP on brain neurones. *J Auton Pharmacol.* 16, 407-11.
- Iwahashi, C.K., et al., 2006. Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS. *Brain.* 129, 256-71.
- Izac, S.M., Eeg, T.R., 2006. Basic anatomy and physiology of sleep. *Am J Electroneurodiagnostic Technol.* 46, 18-38.
- Jacobs, A.E., et al., 1990. The calcium homeostasis and the membrane potential of cultured muscle cells from patients with myotonic dystrophy. *Biochim Biophys Acta.* 1096, 14-9.
- Jansen, G., et al., 1994. Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)<sub>n</sub> repeat variation and selection against extreme expansion in sperm. *Am J Hum Genet.* 54, 575-85.
- Jansen, G., et al., 1996. Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet.* 13, 316-24.

- Jiang, H., 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, 3079-88.
- Jin, P., et al., 2003. RNA-mediated neurodegeneration caused by the fragile X premutation rCGG repeats in *Drosophila*. *Neuron.* 39, 739-47.
- Jin, P., et al., 2007. Pur alpha binds to rCGG repeats and modulates repeat-mediated neurodegeneration in a *Drosophila* model of fragile X tremor/ataxia syndrome. *Neuron.* 55, 556-64.
- Jones, K., et al., 2012. GSK3beta mediates muscle pathology in myotonic dystrophy. *J Clin Invest.* 122, 4461-72.
- Jung, J., Bonini, N., 2007. CREB-binding protein modulates repeat instability in a *Drosophila* model for polyQ disease. *Science.* 315, 1857-9.
- Junghans, R.P., 2009. Dystrophia myotonia: why focus on foci? *Eur J Hum Genet.* 17, 543-53.
- Kalandadze, A., Wu, Y., Robinson, M.B., 2002. Protein kinase C activation decreases cell surface expression of the GLT-1 subtype of glutamate transporter. Requirement of a carboxyl-terminal domain and partial dependence on serine 486. *J Biol Chem.* 277, 45741-50.
- Kaliman, P., Llagostera, E., 2008. Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1. *Cell Signal.* 20, 1935-41.
- Kalsotra, A., 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, 20333-8.
- Kanadia, R.N., et al., 2003a. A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science.* 302, 1978-80.
- Kanadia, R.N., et al., 2003b. Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3. *Gene Expr Patterns.* 3, 459-62.
- Kanadia, R.N., 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, 11748-53.
- Kanai, Y., Hediger, M.A., 2004. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch.* 447, 469-79.
- Kandel, S., Jessel, 2000. Principles of neural science. McGraw-Hill Companies, Incorporated.
- Katayama, S., et al., 2005. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science.* 309, 1564-6.
- Kennedy, L., Shelbourne, P.F., 2000. Dramatic mutation instability in HD mouse striatum: does polyglutamine load contribute to cell-specific vulnerability in Huntington's disease? *Hum Mol Genet.* 9, 2539-44.
- Kimura, T., et al., 2005. Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet.* 14, 2189-200.
- Klesert, T.R., et al., 2000. Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat Genet.* 25, 105-9.

- Kobayakawa, M., Tsuruya, N., Kawamura, M., 2012. Theory of mind impairment in adult-onset myotonic dystrophy type 1. *Neurosci Res.* 72, 341-6.
- Kohr, G., 2006. NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res.* 326, 439-46.
- Koob, M.D., et al., 1999. An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nat Genet.* 21, 379-84.
- Koshelev, M., et al., 2010. Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet.* 19, 1066-75.
- Kovtun, I.V., et al., 2007. OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. *Nature.* 447, 447-52.
- Krol, J., et al., 2007. Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets. *Mol Cell.* 25, 575-86.
- Kumar, R., Vadlamudi, R.K., 2002. Emerging functions of p21-activated kinases in human cancer cells. *J Cell Physiol.* 193, 133-44.
- Kunkel, T.A., 1993. Nucleotide repeats. Slippery DNA and diseases. *Nature.* 365, 207-8.
- Kuyumcu-Martinez, N.M., Wang, G.S., 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.
- La Spada, A.R., et al., 1991. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature.* 352, 77-9.
- Laberge, L., et al., 2007. The correlation of CTG repeat length with material and social deprivation in myotonic dystrophy. *Clin Genet.* 71, 59-66.
- Ladd, A.N., Charlet, N., Cooper, T.A., 2001. The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol Cell Biol.* 21, 1285-96.
- Lalo, U., et al., 2006. NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci.* 26, 2673-83.
- Lau, C.G., Zukin, R.S., 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8, 413-26.
- Lavedan, C., et al., 1993. Myotonic dystrophy: size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism. *Am J Hum Genet.* 52, 875-83.
- Lee, J.E., Bennett, C.F., Cooper, T.A., 2012. RNase H-mediated degradation of toxic RNA in myotonic dystrophy type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 4221-6.
- Leger, A.J., et al., 2013. Systemic Delivery of a Peptide-Linked Morpholino Oligonucleotide Neutralizes Mutant RNA Toxicity in a Mouse Model of Myotonic Dystrophy. *Nucleic Acid Ther.* 23, 109-117.
- Leroy, O., et al., 2006. ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type I. *J Neurosci Res.* 852-9
- Lia, A.S., et al., 1998. Somatic instability of the CTG repeat in mice transgenic for the myotonic dystrophy region is age dependent but not correlated to the relative intertissue transcription levels and proliferative capacities. *Hum Mol Genet.* 7, 1285-1291.



- Libby, R.T., et al., 2003. Genomic context drives SCA7 CAG repeat instability, while expressed SCA7 cDNAs are intergenerationally and somatically stable in transgenic mice. *Hum Mol Genet.* 12, 41-50.
- Lin, C.H., et al., 2010. The CAG repeat in SCA12 functions as a cis element to up-regulate PPP2R2B expression. *Hum Genet.* 128, 205-12.
- Lin, X., et al., 2006. Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet.* 15, 2087-97.
- Lin, Y., Wilson, J.H., 2007. Transcription-induced CAG repeat contraction in human cells is mediated in part by transcription-coupled nucleotide excision repair. *Mol Cell Biol.* 27, 6209-17.
- Liquori, C.L., et al., 2001. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science.* 293, 864-7.
- Liu, G., Leffak, M., 2012. Instability of (CTG) $n^*$ (CAG) $n$  trinucleotide repeats and DNA synthesis. *Cell Biosci.* 2, 7.
- Lopez Castel, A., Cleary, J.D., Pearson, C.E., 2010. Repeat instability as the basis for human diseases and as a potential target for therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11, 165-70.
- Lutz, R.E., 2007. Trinucleotide repeat disorders. *Semin Pediatr Neurol.* 14, 26-33.
- Mahadevan, M., et al., 1992. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science.* 255, 1253-5.
- Mahadevan, M.S., et al., 2006. Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. *Nat Genet.* 38, 1066-70.
- Mankodi, A., et al., 2000. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science.* 289, 1769-73.
- Mankodi, A., et al., 2001. Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet.* 10, 2165-70.
- Mankodi, A., et al., 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.
- Mankodi, A., et al., 2005. Nuclear RNA foci in the heart in myotonic dystrophy. *Circ Res.* 97, 1152-5.
- Manley, K., et al., 1999. Msh2 deficiency prevents in vivo somatic instability of the CAG repeat in Huntington disease transgenic mice. *Nat Genet.* 23, 471-473.
- Manto, P., 2002. *The Cerebellum and Its Disorders.* Cambridge University Press.
- Marteyn, A., et al., 2011. Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy. *Cell Stem Cell.* 8, 434-44.
- Marti, T.M., Kunz, C., Fleck, O., 2002. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physiol.* 191, 28-41.
- Masuda, A., et al., 2012. CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci Rep.* 2, 209.
- Matsuura, T., et al., 2000. Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nat Genet.* 26, 191-4.

- Matynia, A., 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, e9857.
- McMurray, C.T., 2010. Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nat Rev Genet*. 11, 786-99.
- Meola, G., et al., 2003. Executive dysfunction and avoidant personality trait in myotonic dystrophy type 1 (DM-1) and in proximal myotonic myopathy (PROMM/DM-2). *Neuromuscul Disord*. 13, 813-21.
- Meola, G., Sansone, V., 2007. Cerebral involvement in myotonic dystrophies. *Muscle Nerve*. 36, 294-306.
- Miller, J.W., et al., 2000. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *Embo J*. 19, 4439-48.
- Minnerop, M., et al., 2011. The brain in myotonic dystrophy 1 and 2: evidence for a predominant white matter disease. *Brain*. 3530-46.
- Mizukami, K., et al., 1999. An autopsy case of myotonic dystrophy with mental disorders and various neuropathologic features. *Psychiatry Clin Neurosci*. 53, 51-5.
- Modoni, A., et al., 2008. Cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1 (DM1): a longitudinal follow-up study. *J Neurol*. 255, 1737-42.
- Monckton, D.G., et al., 1995. Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses. *Hum Mol Genet*. 4, 1-8.
- Moseley, M.L., et al., 2006. Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8. *Nat Genet*. 38, 758-69.
- Mulders, S.A., et al., 2009. Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 13915-20.
- Mulders, S.A., et al., 2010. Molecular therapy in myotonic dystrophy: focus on RNA gain-of-function. *Hum Mol Genet*. 19, 90-97.
- Musova, Z., et al., 2009. Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene. *Am J Med Genet A*. 149A, 1365-74.
- O'Halloran, C.J., Kinsella, G.J., Storey, E., 2012. The cerebellum and neuropsychological functioning: a critical review. *J Clin Exp Neuropsychol*. 34, 35-56.
- O'Shea, R.D., 2002. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 29, 1018-23.
- Oberle, I., et al., 1991. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*. 252, 1097-102.
- Ofori, L.O., et al., 2012. From dynamic combinatorial 'hit' to lead: in vitro and in vivo activity of compounds targeting the pathogenic RNAs that cause myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res*. 40, 6380-90.
- Ono, S., et al., 1995. Myotonic dystrophy with alveolar hypoventilation and hypersomnia: a clinicopathological study. *J Neurol Sci*. 128, 225-31.

- Ono, S., et al., 1998. Loss of serotonin-containing neurons in the raphe of patients with myotonic dystrophy: a quantitative immunohistochemical study and relation to hypersomnia. *Neurology*. 50, 535-8.
- Orengo, J.P., 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, 2646-51.
- Orengo, J.P., Ward, A.J., Cooper, T.A., 2011. Alternative splicing dysregulation secondary to skeletal muscle regeneration. *Ann Neurol*. 69, 681-90.
- Orr, H.T., Zoghbi, H.Y., 2007. Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci*. 30, 575-621.
- Osborne, R.J., et al., 2009. Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*. 18, 1471-81.
- Otten, A.D., Tapscott, S.J., 1995. Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92, 5465-9.
- Panaite, P.A., et al., 2008. Myotonic dystrophy transgenic mice exhibit pathologic abnormalities in diaphragm neuromuscular junctions and phrenic nerves. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 67, 763-772.
- Panaite, P.A., et al., 2011. Peripheral neuropathy is linked to a severe form of myotonic dystrophy in transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 70, 678-85.
- Panaite, P.A., et al., 2013. Functional and histopathological identification of the respiratory failure in a DMSXL transgenic mouse model of myotonic dystrophy. *Dis Model Mech*. 6, 622-31.
- Parkesh, R., et al., 2012. Design of a bioactive small molecule that targets the myotonic dystrophy type 1 RNA via an RNA motif-ligand database and chemical similarity searching. *J Am Chem Soc*. 134, 4731-42.
- Parvizi, J., et al., 2001. Pathological laughter and crying: a link to the cerebellum. *Brain*. 124, 1708-19.
- Pascual, M., et al., 2006. The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation*. 74, 65-80.
- Pastalkova, E., et al., 2006. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science*. 313, 1141-4.
- Pearson, C.E., Nichol Edamura, K., Cleary, J.D., 2005. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet*. 6, 729-42.
- Peixoto, A., et al., 2004. Quantification of multiple gene expression in individual cells. *Genome Res*. 14, 1938-47.
- Pelletier, R., et al., 2003. Replication and expansion of trinucleotide repeats in yeast. *Mol Cell Biol*. 23, 1349-57.
- Perbellini, R., et al., 2011. Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord*. 21, 81-8.
- Peric, S., et al., 2012. Influence of multisystemic affection on health-related quality of life in patients with myotonic dystrophy type 1. *Clin Neurol Neurosurg*. 270-5.

- Petruska, J., Hartenstine, M.J., Goodman, M.F., 1998. Analysis of strand slippage in DNA polymerase expansions of CAG/CTG triplet repeats associated with neurodegenerative disease. *J Biol Chem.* 273, 5204-10.
- Philips, A.V., Timchenko, L.T., Cooper, T.A., 1998. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science.* 280, 737-41.
- Picchio, L., et al., 2013. Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression. *Hum Mol Genet.* 2795-810.
- Poulos, M.G., et al., 2013. Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice. *Hum Mol Genet.*
- Rasmussen, A., et al., 2001. Clinical and genetic analysis of four Mexican families with spinocerebellar ataxia type 10. *Ann Neurol.* 50, 234-9.
- Rau, F., et al., 2011. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol.* 18, 840-5.
- Reardon, W., et al., 1993. The natural history of congenital myotonic dystrophy: mortality and long term clinical aspects. *Arch Dis Child.* 68, 177-81.
- Reddy, S., et al., 1996. Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet.* 13, 325-35.
- Richards, R.I., et al., 1991. Fragile X syndrome: genetic localisation by linkage mapping of two microsatellite repeats FRAXAC1 and FRAXAC2 which immediately flank the fragile site. *J Med Genet.* 28, 818-23.
- Richter, S., et al., 2007. Patients with chronic focal cerebellar lesions show no cognitive abnormalities in a bedside test. *Neurocase.* 13, 25-36.
- Robbins, T.W., Arnsten, A.F., 2009. The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annu Rev Neurosci.* 32, 267-87.
- Rogers, K.L., et al., 2007. Non-invasive in vivo imaging of calcium signaling in mice. *PLoS One.* 2, e974.
- Romeo, V., et al., 2010a. Brain involvement in myotonic dystrophies: neuroimaging and neuropsychological comparative study in DM1 and DM2. *J Neurol.* 1246-55.
- Romeo, V., et al., 2010b. Retrospective study on PET-SPECT imaging in a large cohort of myotonic dystrophy type 1 patients. *Neurol Sci.* 31, 757-63.
- Romigi, A., et al., 2011. Sleep disorders in adult-onset myotonic dystrophy type 1: a controlled polysomnographic study. *Eur J Neurol.* 18, 1139-45.
- Rothstein, J.D., et al., 2005. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature.* 433, 73-7.
- Rubinsztein, J.S., et al., 1998. Apathy and hypersomnia are common features of myotonic dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 64, 510-5.
- Rudnicki, D.D., et al., 2007. Huntington's disease-like 2 is associated with CUG repeat-containing RNA foci. *Ann Neurol.* 61, 272-82.
- Sacchetti, B., Scelfo, B., Strata, P., 2005. The cerebellum: synaptic changes and fear conditioning. *Neuroscientist.* 11, 217-27.

- Samadashwily, G.M., Raca, G., Mirkin, S.M., 1997. Trinucleotide repeats affect DNA replication in vivo. *Nat Genet.* 17, 298-304.
- Sarkar, P.S., et al., 2000. Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat Genet.* 25, 110-4.
- Savkur, R.S., Philips, A.V., Cooper, T.A., 2001. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet.* 29, 40-7.
- Savkur, R.S., et al., 2004. Insulin receptor splicing alteration in myotonic dystrophy type 2. *Am J Hum Genet.* 74, 1309-13.
- Savouret, C., et al., 2003. CTG repeat instability and size variation timing in DNA repair-deficient mice. *EMBO J.* 22, 2264-73.
- Savouret, C., et al., 2004. MSH2-dependent germinal CTG repeat expansions are produced continuously in spermatogonia from DM1 transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 24, 629-37.
- Sacchetti, B., Scelfo, B., Strata, P., 2005. The cerebellum: synaptic changes and fear conditioning. *Neuroscientist.* 11, 217-27.
- Schmahmann, J.D., 1998. Dysmetria of thought: clinical consequences of cerebellar dysfunction on cognition and affect. *Trends in Cognitive Sciences.* 2, 362-371.
- Schmahmann, J.D., Sherman, J.C., 1998. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain.* 121 ( Pt 4), 561-79.
- Schmahmann, J.D., 2004. Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 16, 367-78.
- Schmahmann, J.D., Caplan, D., 2006. Cognition, emotion and the cerebellum. *Brain.* 129, 290-2.
- Schmahmann, J.D., Weilburg, J.B., Sherman, J.C., 2007. The neuropsychiatry of the cerebellum - insights from the clinic. *Cerebellum.* 6, 254-67.
- Scott, D.B., et al., 2001. An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neurosci.* 21, 3063-72.
- Scott, D.B., Blanpied, T.A., Ehlers, M.D., 2003. Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXR-mediated ER retention and regulates the surface delivery of NMDA receptors. *Neuropharmacology.* 45, 755-67.
- Seixas, A.I., et al., 2012. Loss of junctophilin-3 contributes to Huntington disease-like 2 pathogenesis. *Ann Neurol.* 71, 245-57.
- Sellier, C., et al., 2010. Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients. *EMBO J.* 29, 1248-61.
- Sellier, C., et al., 2013. Sequestration of DROSHA and DGCR8 by expanded CGG RNA repeats alters microRNA processing in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Cell Rep.* 3, 869-80.
- Sergeant, N., et al., 2001. Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet.* 10, 2143-55.

- Seznec, H., et al., 2000. Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability. *Hum Mol Genet.* 9, 1185-1194.
- Seznec, H., et al., 2001. Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum Mol Genet.* 10, 2717-26.
- Shin, J.Y., et al., 2005. Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J Cell Biol.* 171, 1001-12.
- Sicot, G., Gourdon, G., Gomes-Pereira, M., 2011. Myotonic dystrophy, when simple repeats reveal complex pathogenic entities: new findings and future challenges. *Hum Mol Genet.* 20, R116-23.
- Sicot, G., Gomes-Pereira, M., 2013. RNA toxicity in human disease and animal models: From the uncovering of a new mechanism to the development of promising therapies. *Biochim Biophys Acta.* 1390-409.
- Sims, K.D., Robinson, M.B., 1999. Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. *Crit Rev Neurobiol.* 13, 169-97.
- Sofola, O.A., et al., 2007. RNA-binding proteins hnRNP A2/B1 and CUGBP1 suppress fragile X CGG premutation repeat-induced neurodegeneration in a *Drosophila* model of FXTAS. *Neuron.* 55, 565-71.
- Southwell, A.L., et al., 2012. Antisense oligonucleotide therapeutics for inherited neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med.* 18, 634-43.
- Steinert, 1909. Myopathologische Beiträge. I. Ober das klinische und anatomische Bild des Muskelschwunds der Myotoniker. *Dtsch.Z.Nervenheilk.*, 37,58.
- Steyaert, J., et al., 1997. A study of the cognitive and psychological profile in 16 children with congenital or juvenile myotonic dystrophy. *Clin Genet.* 52, 135-41.
- Steyaert, J., et al., 2000. Behavioral phenotype in childhood type of dystrophia myotonica. *Am J Med Genet.* 96, 888-9.
- Stoodley, C.J., Schmahmann, J.D., 2009. Functional topography in the human cerebellum: a meta-analysis of neuroimaging studies. *Neuroimage.* 44, 489-501.
- Strand, M., et al., 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature.* 365, 274-6.
- Strick, P.L., Dum, R.P., Fiez, J.A., 2009. Cerebellum and nonmotor function. *Annu Rev Neurosci.* 32, 413-34.
- Suenaga, K., et al., 2012. Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain. *PLoS One.* 7, e33218.
- Suzuki, M., et al., 2012. Calcium leak through ryanodine receptor is involved in neuronal death induced by mutant huntingtin. *Biochem Biophys Res Commun.* 429, 18-23.
- Takahashi, T., Katada, S., Onodera, O., 2010. Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going? *J Mol Cell Biol.* 2, 180-91.
- Tanaka, K., et al., 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science.* 276, 1699-702.

- Tang, Z.Z., et al., 2012. Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca(V)1.1 calcium channel. *Hum Mol Genet.* 21, 1312-24.
- Taneja, K.L., et al., 1995. Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J Cell Biol.* 128, 995-1002.
- Tassone, F., Iwahashi, C., Hagerman, P.J., 2004. FMR1 RNA within the intranuclear inclusions of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *RNA Biol.* 1, 103-5.
- Teive, H.A., et al., 2011. Spinocerebellar ataxia type 10 - A review. *Parkinsonism Relat Disord.* 17, 655-61.
- Terenzi, F., Ladd, A.N., 2010. Conserved developmental alternative splicing of muscleblind-like (MBNL) transcripts regulates MBNL localization and activity. *RNA Biol.* 7, 43-55.
- Thornton, C.A., Johnson, K., Moxley, R.T., 3rd, 1994. Myotonic dystrophy patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes. *Ann Neurol.* 35, 104-7.
- Thornton, C.A., et al., 1997. Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene. *Nat Genet.* 16, 407-9.
- Tian, B., et al., 2000. Expanded CUG repeat RNAs form hairpins that activate the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Rna.* 6, 79-87.
- Tian, L., et al., 2009. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Methods.* 6, 875-81.
- Timchenko, L.T., et al., 1996. Identification of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res.* 24, 4407-14.
- Timchenko, N.A., et al., 1999. CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPβ mRNA and regulates translation of C/EBPβ isoforms. *Nucleic Acids Res.* 27, 4517-25.
- Timchenko, N.A., et al., 2001. Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol Cell Biol.* 21, 6927-38.
- Timchenko, N.A., et al., 2004. Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *J Biol Chem.* 279, 13129-39.
- Todd, P.K., et al., 2013. CGG Repeat-Associated Translation Mediates Neurodegeneration in Fragile X Tremor Ataxia Syndrome. *Neuron.* 78, 440-55.
- Tome, S., et al., 2009. MSH2 ATPase domain mutation affects CTG\* CAG repeat instability in transgenic mice. *PLoS Genet.* 5, e1000482.
- Tran, H., et al., 2011. Analysis of exonic regions involved in nuclear localization, splicing activity, and dimerization of Muscleblind-like-1 isoforms. *J Biol Chem.* 286, 16435-46.
- Turner, C., Hilton-Jones, D., 2010. The myotonic dystrophies: diagnosis and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 81, 358-67.
- van Den Broek, W.J., et al., 2002. Somatic expansion behaviour of the (CTG)<sub>n</sub> repeat in myotonic dystrophy knock-in mice is differentially affected by Msh3 and Msh6 mismatch-repair proteins. *Hum Mol Genet.* 11, 191-8.

- Van Spaendonck, K.P., et al., 1995. Cognitive function in early adult and adult onset myotonic dystrophy. *Acta Neurol Scand.* 91, 456-61.
- Verkerk, A.J., et al., 1991. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell.* 65, 905-14.
- Vermersch, P., et al., 1996. Specific tau variants in the brains of patients with myotonic dystrophy. *Neurology.* 47, 711-7.
- Voogd, J., Glickstein, M., 1998. The anatomy of the cerebellum. *Trends in Cognitive Sciences.* 2, 307-313.
- Wang, F., et al., 2012. Bergmann glia modulate cerebellar Purkinje cell bistability via Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 7911-6.
- Wang, G.S., 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, 2802-11.
- Wang, G.S., et al., 2009. PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1. *J Clin Invest.* 119, 3797-806.
- Wang, Y.C., et al., 2011. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress contribute to the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 12 (SCA12). *J Biol Chem.* 286, 21742-54.
- Wang, Y.H., et al., 1994. Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeats from the myotonic dystrophy gene. *Science.* 265, 669-71.
- Ward, A.J., et al., 2010. CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet.* 19, 3614-22.
- Warf, M.B., et al., 2009. Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 18551-6.
- Weber, Y.G., et al., 2010. Comparative analysis of brain structure, metabolism, and cognition in myotonic dystrophy 1 and 2. *Neurology.* 74, 1108-17.
- Wenthold, R.J., et al., 2003. Trafficking of NMDA receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43, 335-58.
- Wheeler, T.M., et al., 2007. Correction of CIC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *J Clin Invest.* 117, 3952-7.
- Wheeler, T.M., et al., 2009. Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science.* 325, 336-9.
- Wheeler, T.M., et al., 2012. Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature.* 488, 111-5.
- White, M., et al., 2012. Transgenic mice with SCA10 pentanucleotide repeats show motor phenotype and susceptibility to seizure: a toxic RNA gain-of-function model. *J Neurosci Res.* 90, 706-14.
- White, M.C., et al., 2010. Inactivation of hnRNP K by expanded intronic AUUCU repeat induces apoptosis via translocation of PKCdelta to mitochondria in spinocerebellar ataxia 10. *PLoS Genet.* 6, e1000984.
- Wilburn, B., et al., 2011. An antisense CAG repeat transcript at JPH3 locus mediates expanded polyglutamine protein toxicity in Huntington's disease-like 2 mice. *Neuron.* 70, 427-40.



- Winblad, S., Lindberg, C., Hansen, S., 2005. Temperament and character in patients with classical myotonic dystrophy type 1 (DM-1). *Neuromuscul Disord.* 15, 287-92.
- Wozniak, J.R., et al., 2011. White matter abnormalities and neurocognitive correlates in children and adolescents with myotonic dystrophy type 1: a diffusion tensor imaging study. *Neuromuscul Disord.* 21, 89-96.
- Yadava, R.S., et al., 2008. RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression. *Nat Genet.* 40, 61-8.
- Yang, Z., et al., 2003. Replication inhibitors modulate instability of an expanded trinucleotide repeat at the myotonic dystrophy type 1 disease locus in human cells. *Am J Hum Genet.* 73, 1092-105.
- Yotova, V., et al., 2005. Anatomy of a founder effect: myotonic dystrophy in Northeastern Quebec. *Hum Genet.* 117, 177-87.
- Yu, H., et al., 2011a. Daytime sleepiness and REM sleep characteristics in myotonic dystrophy: a case-control study. *Sleep.* 34, 165-70.
- Yu, Z., Teng, X., Bonini, N.M., 2011b. Triplet repeat-derived siRNAs enhance RNA-mediated toxicity in a *Drosophila* model for myotonic dystrophy. *PLoS Genet.* 7, e1001340.
- Zhang, W., et al., 2002. Region-specific alternative splicing in the nervous system: implications for regulation by the RNA-binding protein NAPOR. *RNA.* 8, 671-85.
- Zu, T., et al., 2011. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 260-5.
- Zukin, R.S., Bennett, M.V., 1995. Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci.* 18, 306-13.