



HAL
open science

Mise en place, caractérisation phénotypique et transcriptomique d'un modèle de Drosophilie de la Dystrophie Myotonique de type 1

Lucie Picchio

► **To cite this version:**

Lucie Picchio. Mise en place, caractérisation phénotypique et transcriptomique d'un modèle de Drosophilie de la Dystrophie Myotonique de type 1. Biologie du développement. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2013. Français. NNT : 2013CLF1MM15 . tel-01165231

HAL Id: tel-01165231

<https://theses.hal.science/tel-01165231>

Submitted on 18 Jun 2015

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.

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
N° d'ordre :

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne

pour l'obtention du grade de DOCTEUR
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Biologie du développement et génétique

soutenue publiquement le 5 décembre 2013

PICCHIO Lucie

Mise en place, caractérisation phénotypique et
transcriptomique d'un modèle de Drosophile de la
Dystrophie Myotonique de type 1

JURY

Président	M. SAPIN Vincent
Examinatrice	M. SIMONELIG Martine
Rapporteur	M. CHARLET-BERGUERAND Nicolas
Rapporteur	M. BODMER Rolf
Directeur de thèse	M. JAGLA Krzysztof

À pépé Roger et mémé Nisette

REMERCIEMENTS **Krzysztof Jagla**, le GReD, Martine Simonelig, Nicolas Charlet-Berguerand, Rolf Bodmer, mon père, Fanette, Mel, **Capucine** et ses (anges) gardiens, **Benoit**, ma mère, mémé Yvonne, Cécile et Georges, ma belle famille, Julie, Annabelle, Antony, Sandrine, Vanessa, Laetitia, Emilie, Vincent Sapin, Térésa, Monika, Cyrille, Ouarda, Max, Jean-Philippe et Aurélie, Céline, Nicolas, Florence, Preethi, Sabine, Jean-Louis, Caro, πr^2 (Blanc et Pouchin), Inga, Guillaume, Cédric, Benjamin, Yoan, Cynthia, Catherine, Stéphanie, Svetlana, l'ensemble de l'administration et du personnel technique du GReD

AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse a été effectué dans l'équipe « Diversification des cellules musculaires et cardiaques au cours du développement normal et pathologique » au sein du laboratoire Génétique, Reproduction et Développement (GReD) de Clermont-Ferrand qui est une unité mixte de recherche CNRS 6293, INSERM U1103 et Clermont université.

Il a donné lieu aux publications et communications suivantes :

**Articles publiés ou en cours de publication dans des revues
internationales à comité de lecture**

Picchio L, Plantie E, Renaud Y, Poovthumkadavil P, Jagla K.

Novel Drosophila model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression.

Hum Mol Genet. 2013 Jul 15 (**Article 1**)

Picchio L, Renaud Y, Jagla K.

Drosophila CUGBP1 orthologue, Bruno-3, contributes to muscle phenotypes of Myotonic Dystrophy type 1 and regulates sarcomere components synthesis.

En préparation (**Article 2**)

L'article de revue suivant est présenté en annexe :

Daczewska M, Picchio L, Jagla T, Figeac N, Jagla K.

Muscle development and regeneration in normal and pathological conditions: learning from Drosophila.

Curr Pharm Des. 2010. Review (**Article 3**)

Communications orales ou affichées réalisées en congrès

Communications orales en congrès ou conférences avec comité de lecture

Mise en place et caractérisation phénotypique d'un modèle drosophilien de la Dystrophie Myotonique de type 1, **Colloque Myogénèse XII, Cassis (France), June 2009**

Setting up and characterization of a *Drosophila* model of Myotonic Dystrophy of type 1: identification of molecular bases by deep sequencing, **7th MYORES workshop, "New imaging approaches: from theory to application", Pérignat les Salièves (France), April 19-20, 2010**

Mise en place et caractérisation des phénotypes cardiaques d'un modèle de Drosophile de la dystrophie myotonique de type 1, **Journées de l'Ecole Doctorale 2012, Clermont-Ferrand (France), May 24-25, 2012**

Characterization of a new *Drosophila* larval model of Myotonic Dystrophy type I and its application in a genome wide screen for genes involved in DM1, **French Drosophila Conference 2012, Clermont-Ferrand (France), September 10-13, 2012**

Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genom-wide view of altered gene expression, **Xèmes JSFM et Colloque Myogénèse, Grenoble (France), November 14-16, 2012**

Communications affichées

A *Drosophila* model of Myotonic Dystrophy type 1, **7th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting, Würzburg (Germany), September 9–12, 2009**

Cardiac phenotypic characterization of a *Drosophila* model of Myotonic Dystrophy type 1, **1st Joint Meeting of the French & Spanish Developmental Biology Societies, Toulouse (France), November 7-10, 2009**

"Setting up and characterization of muscle phenotypes of a *Drosophila* model of Myotonic Dystrophy of type 1" and "Characterization of cardiac phenotypes of a *Drosophila* model of Myotonic Dystrophy of type 1", **JSFM2011 (Journées de la Société Française de Myologie), Angers (France), November 3-5, 2011**

Setting up and cardiac characterization of a *Drosophila* model of Myotonic Dystrophy of type 1, **Myology 2011 (AFM), 4e Congrès international dédié à la myologie, Lille (France), May 9-13, 2011**

Muscle characterization of a new *Drosophila* larval model of myotonic dystrophy of type 1 (DM1), **Society for Muscle biology Development: "Function and Repair of the Muscle Cell", New York, June 4-8, 2012**

Drosophila CUGBP1 orthologue, Bruno-3, contributes to muscle phenotypes of Myotonic Dystrophy type 1 and regulates sarcomere components turnover, **9th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting, San Sebastian (Spain), October 15–20, 2013**

RESUME

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) ou maladie de Steinert est la maladie génétique neuromusculaire la plus commune avec une incidence de 1/8000 à travers le monde. Cette maladie multisystémique touche particulièrement les muscles squelettiques (myotonie, faiblesse et perte musculaires) et le cœur qui présente des symptômes variés comme des troubles de la conduction et des arythmies. La DM1 est causée par une expansion instable de répétitions CTG dans la région 3' non traduite du gène *DMPK*. Les individus sains possèdent entre 5 et 37 répétitions CTG tandis que les patients DM1 portent entre 50 et plusieurs milliers de répétitions. Il est bien établi que les expansions de répétitions non codantes forment des *foci* dans les noyaux musculaires où elles séquestrent le facteur d'épissage MBNL1. Toutefois, l'implication de la stabilisation et l'accumulation de CUGBP1 hyperphosphorylé par la PKC dans la maladie est un sujet controversé dans la communauté DM1. Dernièrement, en plus de la rupture de l'équilibre entre MBNL1/CUGBP1, plusieurs mécanismes ont été mis en cause dans la pathogenèse de la DM1. Parmi eux, l'expression perturbée de facteurs de transcription, la maturation altérée de miARNs, l'activation de kinases... chacune de ces altérations menant au final à une perturbation du transcriptome.

Afin d'étudier l'effet de la toxicité des répétitions sur les phénotypes et les transcriptomes, nous avons généré trois lignées de *Drosophile* inductibles et site-spécifiques exprimant 240, 600 et 960 répétitions de triplets. Nous avons travaillé en parallèle sur une lignée atténuée pour *mbi* (orthologue de *MBNL1*) et deux lignées gain de fonction *bru -3* (orthologue de *CUGBP1*).

Exprimées dans les muscles somatiques, les répétitions CTG conduisent à une mobilité réduite, le fractionnement des fibres musculaires, une réduction de leur taille et une altération du processus de fusion des myoblastes de manière dépendante de *Mbl* et *Bru-3*. En outre, l'expression des répétitions cause une hypercontraction musculaire dépendante de *Mbl* et due à un mauvais épissage de *dSERCA*. L'analyse transcriptionnelle comparative réalisée sur les muscles larvaires des différentes conditions pathologiques montre que l'atténuation de *mbi* reproduit 70-82 % des dérégulations transcriptomiques des larves DM1 alors que le gain de fonction *bru-3* représente 32-53 % des altérations transcriptomiques des lignées DM1. Ainsi *Mbl* est un facteur clé des dérégulations observées dans les muscles somatiques des lignées DM1.

Au contraire, les analyses physiologiques effectuées sur les cœurs adultes suggèrent que *Bru-3* est un facteur clé dans la mise en place des phénotypes

cardiaques. En effet, d'une part, l'atténuation de *mb1* dans le cœur cause une cardiomyopathie dilatée, un symptôme rarement diagnostiqué chez les patients. D'autre part, les lignées gain de fonction *bru-3* et DM1 présentent de la fibrillation qui évolue avec l'âge ou la taille des répétitions vers un phénotype qui rappelle l'insuffisance cardiaque chez les patients.

ABSTRACT

Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1) or Steinert's disease is the most common genetic neuromuscular disorder affecting 1 out of 8000 people worldwide. This multisystemic disease affects particularly the skeletal muscles (myotonia, muscle weakness and wasting) and the heart, which can exhibit various symptoms like conduction disturbances and arrhythmia (auricular fibrillation and flutter). DM1 is caused by an unstable CTG repeat expansion in the 3' non-translated region of the *DMPK* gene. In healthy individuals, the number of CTG repeats ranges from 5 to 37 whereas DM1 patients carry from 50 to thousands repeats. It is well established that when expanded non-coding repeats aggregate into *foci* within muscle nuclei and sequester the MBNL1 splicing factor. However, the involvement of the stabilization and accumulation of CUGBP1 following PKC hyper-phosphorylation in the disease is a controversial matter in the DM1 community. Lately, in addition to the disruption of the balance between MBNL1/CUGBP1, several mechanisms were identified as part of the DM1 pathogenesis. Among them, transcription factors perturbations, altered maturation of miRNA, kinases activation... each of them leading eventually to transcriptomic alterations.

In order to investigate the effect of toxic repeat expression on phenotypic and transcriptomic alterations, we generated three inducible site-specific *Drosophila* lines expressing 240, 600 and 960 triplet repeats. We worked in parallel on a *mbl* (*MBNL1* orthologue) knocked-down line and two *bru-3* (*CUGBP1* orthologue) gain of function lines.

When expressed in somatic muscles, CTG repeats lead to altered motility, fiber splitting, reduced fiber size and affected myoblast fusion process in a Mbl and Bru-3 dependent manner. In addition, toxic repeats cause fiber hyper-contraction in a Mbl-dependent manner due to *dSERCA* mis-splicing. Comparative transcriptional profiling performed on larval muscles of different conditions show that *mbl* attenuation reproduces 70-82% of DM1 transcriptomic deregulations whereas *bru-3* gain of function represents 32-53% of transcriptomic alterations. Thus Mbl appears as a key factor of transcripts deregulations observed in DM1 muscles.

On the contrary, physiologic analyses performed on adult hearts suggest that Bru-3 is a key factor for cardiac phenotypes. Indeed, on one hand, *mbl* attenuated flies display dilated cardiomyopathy, a symptom barely diagnosed in patients. On the other hand, *bru-3* gain of function line and DM1 lines display fibrillation, which evolves with age or repeat size into a phenotype reminiscent of heart insufficiency in patients.

TABLES

Table des matières

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 7

I. LA DYSTROPHIE MYOTONIQUE DE TYPE 1 (DM1) ET LA MUTATION EN CAUSE DANS CETTE PATHOLOGIE	8
1. LA DM1, UNE MALADIE MULTI-SYSTEMIQUE	8
2. IDENTIFICATION DE LA MUTATION A L'ORIGINE DE LA DM1	8
2.1. Une mutation non codante	8
2.2. Corrélation génotype/phénotype : les formes de la DM1	9
3. DYNAMISME DE LA MUTATION ET CONSEQUENCES	9
3.1. Mécanisme d'instabilité des répétitions	10
3.2. Mosaïcisme somatique	11
3.3. Mosaïcisme gonadique et phénomène d'anticipation	11
II. PATHOGENESE DE LA DM1	13
1. EFFETS EN <i>CIS</i> DU GENE MUTE DE LA DMPK	13
1.1. Effet en <i>cis</i> de la mutation sur le gène <i>DMPK</i>	13
1.1.1. <i>Haplo-insuffisance de la protéine DMPK</i>	13
1.1.2. <i>Traduction non-ATG dépendante des transcrits sens et anti-sens et protéotoxicité</i>	14
1.2. Effet en <i>cis</i> de la mutation sur le locus <i>DMPK</i>	15
1.2.1. <i>Hétérochromatinisation du locus DMPK par les expansions CTG</i>	15
1.2.2. <i>Conséquences sur l'expression de DMWD et SIX5</i>	16
2. EFFETS EN <i>TRANS</i> DU TRANSCRIT MUTE <i>DMPK</i>	17
2.1. Effets sur des facteurs de transcription	17
2.1.1. <i>Phénomène de « leaching » des facteurs de transcription</i>	17
2.1.2. <i>Exclusion nucléaire du facteur de transcription SHARP</i>	17
2.1.3. <i>Expression ectopique de NKX2.5 dans les noyaux des muscles squelettiques</i>	18
2.2. Activation des kinases	18
2.3. Altération de l'épissage alternatif	19
2.3.1. <i>Stabilisation du facteur d'épissage CUGBP1</i>	19
2.3.2. <i>Séquestration du facteur d'épissage MBNL1 dans les foci</i>	21
2.3.3. <i>Conséquences sur l'épissage</i>	22
2.4. Altération de la stabilité des transcrits et de la traduction	26
2.5. Rôles des ARNs non codants dans la DM1	27
2.5.1. <i>Implication des miARNs dans la DM1</i>	27

2.5.2. <i>Implication des siARNs dans la DM1</i>	28
III. LE MUSCLE SQUELETTIQUE	29
1. HISTOPATHOLOGIE DES MUSCLES DES PATIENTS DM1	29
1.1. Anatomie du muscle sain	29
1.2. Analyses histologiques des tissus musculaires des patients DM1	29
1.3. Comportement des myoblastes de patients en culture	30
2. MYOGENESE VERTEBRE ET FONCTION MUSCULAIRE	31
2.1. Somitogénèse et formation du dermomyotome	31
2.2. Du précurseur musculaire au myocyte	31
2.2.1. <i>Délamination et migration</i>	31
2.2.2. <i>Prolifération puis différenciation</i>	32
2.3. Formation des fibres musculaires par fusion	32
2.3.1. <i>Les différentes phases de myogenèse</i>	32
2.3.2. <i>Les acteurs moléculaires de la fusion</i>	33
2.4. Différenciation terminale et acquisition de la fonction musculaire	33
2.4.1. <i>Acquisition de l'identité musculaire</i>	34
2.4.2. <i>Attachement et innervation</i>	34
2.4.3. <i>Formation de l'appareil contractile</i>	34
2.4.4. <i>La contraction musculaire</i>	36
3. CONSERVATION DES MECANISMES ET DES BASES MOLECULAIRES DE LA MYOGENESE CHEZ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	37
3.1. Plusieurs vagues de myogenèse	37
3.2. Etapes précoces de la myogenèse embryonnaire : conservation des signaux moléculaires avec la myogenèse vertébrée	39
3.2.1. <i>Détermination du mésoderme et migration</i>	39
3.2.2. <i>Subdivision du mésoderme</i>	39
3.3. Etapes intermédiaires de la myogenèse : une voie mais deux processus de différenciation différents entre Drosophile et vertébré	40
3.3.1. <i>Formation des clusters promusculaires</i>	41
3.3.2. <i>Détermination des myoblastes</i>	41
3.3.3. <i>Facteurs d'identité musculaire : conservation de séquences pour des rôles différents</i>	42
3.4. Etapes terminales : quelques divergences initiales mais une très bonne conservation finale de la fonction musculaire	42
3.4.1. <i>La fusion des myoblastes</i>	42
3.4.2. <i>Attachement des myotubes à l'épiderme et innervation</i>	44
3.4.3. <i>Formation de l'appareil contractile et contraction musculaire</i>	45
IV. LA FONCTION CARDIAQUE AU CŒUR DE LA DM1 : CONSERVATION DES MECANISMES DE CARDIOGENESE ENTRE DROSOPHILE ET VERTEBRES	46
2.1. MISE EN PLACE DU CŒUR CHEZ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	46

2.1.1. Généralités	46
2.1.2. Diversification des cellules cardiaques et péricardiaques	47
2.1.3. Diversification antéro-postérieure du tube cardiaque	48
2.1.4. Remodelage du cœur adulte au cours de la métamorphose	48
2.2. CARIOGENESE DES VERTEBRES PAR COMPARAISON A CELLE DE LA <i>DROSOPHILE</i>	49
2.2.1. Vue d'ensemble du développement cardiaque vertébré	49
2.2.2. Conservation de la structure cardiaque	50
2.2.3. Conservation des gènes et voies de signalisation du développement cardiaque	51
2.3. TROUBLES CARDIAQUES DES PATIENTS DM1	51
2.3.1. Fonctionnement normal d'un cœur sain	51
2.3.2. Anomalies du cœur de patients DM1	52
2.3.2.1. Anomalies de structure	52
2.3.2.2. Troubles de la conduction	53
2.3.2.3. Troubles du rythme	53
2.3.2.4. Insuffisance cardiaque	53
2.3.4. Prédicteurs de mort subite	53
V. LES MODELES ANIMAUX DE LA DM1	55
1. MODELES MURINS	55
1.1. Invalider la thèse de l'haploinsuffisance	55
1.2. Modèles transgéniques du gain de fonction toxique de l'ARN muté	55
1.2.1. Souris exprimant le locus <i>DMPK humain</i>	55
1.2.2. Expression de répétitions non codantes seules	56
1.2.3. Expression inductible et réversible de la région 3' non codante du gène <i>DMPK57</i>	
1.3. Modèles des régulateurs de l'épissage alternatif défectueux	58
1.3.1. Les facteurs <i>MBNLs</i>	58
1.3.2. Rôle de <i>CUGBP1</i>	58
2. MODELE DE <i>C. ELEGANS</i>	59
3. MODELES DE <i>DROSOPHILE</i>	60
3.1. Mouches modèles de pathologies humaines	60
3.1.1. L'explosion du nombre de modèles de mouche ou « <i>Drosophila model boom</i> »	60
3.1.2. Quels avantages la <i>Drosophila</i> offre-t-elle par rapport aux modèles vertébrés ?	60
3.1.3. Un petit pas pour la mouche, un grand pas pour l'homme : focus sur quelques maladies neuromusculaires	61
3.2. Conservation chez <i>Drosophila melanogaster</i> des facteurs d'épissage impliqués dans la DM1	62
3.2.1. <i>bruno-3 (bru-3)</i> , l'orthologue de <i>CUGBP1</i> de la <i>Drosophila</i>	62
3.2.2. <i>muscleblind (mbl)</i> , l'orthologue des <i>MBNLs</i> de la <i>Drosophila</i>	63
3.3. Apports des différents modèles de <i>Drosophila</i> de la DM1	64
3.3.1. Foci non toxiques	64
3.3.2. ARN non codant toxique contenant 480 répétitions CTG interrompues	64

3.3.3. *Modèle de DM1 mimant la transcription bidirectionnelle des répétitions CTG* 65**OBJECTIFS DE TRAVAIL** 66**RESULTATS ET DISCUSSION** 70

I. MISE EN PLACE D'UN NOUVEAU MODELE DE DROSOPHILE DE LA DM1 ET IMPLICATION DE MBL DANS LA PATHOLOGIE	71
1. STRATEGIE EXPERIMENTALE DE LA MISE EN PLACE DU MODELE.....	71
2. ARTICLE 1 : NOVEL DROSOPHILA MODEL OF MYOTONIC DYSTROPHY TYPE 1: PHENOTYPIC CHARACTERIZATION AND GENOME WIDE VIEW OF ALTERED GENE EXPRESSION.	72
3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES NON PUBLIES SUR LE ROLE DE MBL DANS LE SYSTEME MUSCULAIRE	74
3.1. Rôle de Mbl dans la glycolyse du muscle larvaire	74
3.1.1. <i>Résultat</i>	74
3.1.2. <i>Matériel et méthode</i>	75
3.2. Importance de Mbl dans la musculature somatique adulte	75
4. DISCUSSION	76
4.1. Avantages de l'analyse de la musculature larvaire par rapport à la musculature adulte	76
4.2. Interruptions dans les répétitions CTG : stabilité mais toxicité ?	77
4.3. Implication de dSERCA : hypercontraction et/ou fatigue musculaire ?	78
4.3.1. <i>Dérégulation de l'épissage alternatif de dSERCA</i>	78
4.3.2. <i>Altération de l'homéostasie du calcium et fatigue musculaire</i>	78
4.3.3. <i>dSERCA et hypercontraction musculaire</i>	79
4.4. Dérégulations transcriptomiques dépendante de la taille des répétitions CTG	79
4.5. Rôle du métabolisme et de la pyruvate kinase	80
II. IMPLICATION DE BRUNO-3, L'ORTHOLOGUE DE CUGBP1, DANS LA DM1	81
III. ANALYSE PHYSIOLOGIQUE DES PHENOTYPES CARDIAQUES DES DROSOPHILES ADULTES MODELES DE DM1	82
1. RESULTATS	82
1.1. Expression de Mbl et Bru-3 dans le cœur et le muscle adulte	82
1.2. L'expression des transgènes dans le cœur n'affecte pas spécifiquement la survie des lignées pathologiques	83
1.3. Analyse structurale du cœur	83
1.4. Analyse physiologique du cœur	84
1.4.1. <i>Analyse des paramètres contractiles</i>	84
1.4.2. <i>Analyse des paramètres rythmiques</i>	85
2. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	86

2.1. Mbl et Bru-3 à l'origine de symptômes cardiaques différents	86
2.2. La cardiomyopathie dilatée chez les patients DM1	86
2.3. Fibrillation et insuffisance cardiaque	87
2.4. Implication de dSERCA dans les symptômes cardiaques	89
2.5. Conclusion	89
3. MATERIEL ET METHODES.....	90
3.1. Tests de survie	90
3.2. Analyse structurale des coeurs	90
3.3. Analyse physiologique	90
3.3.1. Préparation de <i>Drosophile semi-intacte</i>	90
3.3.2. Analyse des films	90
3.4. Analyses statistiques	91

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 92

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 95

ANNEXES 123

Table des illustrations

- SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE -

- Figure 1. Une amplification instable de triplets CTG dans le gène *DMPK* à l'origine de la DM1
- Figure 2. Visualisation des *foci* nucléaires dans les myoblastes de patients DM1
- Figure 3. Instabilité des répétitions CTG au cours de la réplication
- Figure 4. Instabilité des répétitions CTG au cours de la méiose
- Figure 5. Modèle hypothétique du rôle de *DMPK* dans la DM1
- Figure 6. Traduction ATG-indépendante des répétitions dans la DM1
- Figure 7. Organisation du locus *DMPK*
- Figure 8. Distribution anormale de SHARP dans les myoblastes DM1
- Figure 9. Absence de colocalisation du facteur d'épissage CUGBP1 dans les *foci* nucléaires
- Figure 10. Stabilisation du facteur d'épissage CUGBP1 par la PKC
- Figure 11. Séquestration du facteur d'épissage MBNL1 dans les *foci* nucléaires
- Figure 12. Profils d'expression de MBNL1, MBNL2 et MBNL3
- Figure 13. Représentation schématique des gènes subissant une transition post-natale pendant le développement cardiaque
- Figure 14. Les fonctions biologiques de CUGBP1 contrôlées par phosphorylation différentielle
- Figure 15. Rôles potentiels des mi-RNAs et de leurs cibles dérégulés dans la DM1
- Figure 16. Modèle de l'altération de la maturation de *miR-1* dans les DM
- Figure 17. Schéma bilan de la pathogénèse de la DM1
- Figure 18. Schéma d'organisation du muscle squelettique
- Figure 19. Différenciation altérée des myoblastes exprimant *DMPK* muté
- Figure 20. Somitogénèse et subdivision des somites chez le vertébré
- Figure 21. Représentation schématique de la formation du muscle squelettique dans les membres et des gènes impliqués à chaque stade
- Figure 22. Résumé du modèle des myogénèses embryonnaire, fœtale et adulte du membre de la souris
- Figure 23. Structure des sarcomères
- Figure 24. Modèle de l'assemblage des filaments de myosine avec les myofibrilles
- Figure 25. La contraction musculaire
- Figure 26. Développement des muscles somatiques chez la *Drosophile*
- Figure 27. Structure des muscles embryonnaires de la *Drosophile*
- Figure 28. Les grandes étapes du processus myogénique

- Figure 29. Détermination et migration du mésoderme
- Figure 30. Subdivision du mésoderme de la Drosophile
- Figure 31. Comparaison entre la subdivision du mésoderme de la Drosophile (A) et des somites des vertébrés (B)
- Figure 32. Formation des clusters promusculaires et détermination des myoblastes
- Figure 33. Expression des gènes d'identité dans les muscles embryonnaires
- Figure 34. Rôle des différentes protéines dans la fusion
- Figure 35. Développement du muscle cardiaque chez la Drosophile
- Figure 36. Réseau génique contrôlant la diversification des cardioblastes
- Figure 37. Remodelage du tube cardiaque lors de la métamorphose de la Drosophile
- Figure 38. Morphogénèse du cœur de souris
- Figure 39. Conservation des facteurs de transcription et des voies de signalisation au sein du réseau génique contrôlant le développement cardiaque de la Drosophile et des vertébrés
- Figure 40. Activité électrique normale d'un cœur sain
- Figure 41. Représentation schématique de la construction du transgène de la lignée Tg26
- Figure 42. Représentation schématique de la construction du transgène des lignées DM
- Figure 43. Représentation schématique de la construction du transgène des lignées HSA
- Figure 44. Représentation schématique de la construction du transgène des lignées EpA
- Figure 45. Représentation schématique de la construction du transgène des lignées GFP-DMPK-(CTG)_n
- Figure 46. Développement des modèles de Drosophile de maladies humaines
- Figure 47. Comparaison des séquences protéiques de CUGBP1 avec ses orthologues potentiels chez la Drosophile
- Figure 48. Expression au stade 3 larvaire des orthologues potentiels de *CUGBP1* dans les différents tissus

- RESULTATS ET DISCUSSION -

- Figure 49. Gels d'agarose présentant la mise en place des lignées
- Figure 50. Implication de la glycolyse dans la DM1
- Figure 51. L'atténuation de *mbi* dans les muscles adultes diminue drastiquement la fonction musculaire et la durée de vie
- Figure 52. Expression de *Mbl* et *Bru-3* dans le tube cardiaque et le muscle somatique adulte
- Figure 53. Survie des lignées DM1 induites avec un pilote cardiaque
- Figure 54. Survie des lignées DM1 induites avec un pilote cardiaque
- Figure 55. Paramètres contractiles de la fonction cardiaque des lignées DM1
- Figure 56. Paramètres rythmiques de la fonction cardiaque des lignées DM1
- Figure 57. Amincissement de la paroi du cœur de la lignée *Hand>mbIRNAi*
- Figure 58. Epaissement de la paroi du cœur de la lignée *Hand>960CTG*
- Figure 59. Distribution des phénotypes rythmiques de la lignée *Hand>PKC*
- Figure 60. dSERCA sauve les phénotypes rythmiques mais pas contractiles de la lignée *Hand>mbIRNAi*

Liste des tableaux

- Table 1. Principaux symptômes des formes adultes de la DM1
- Table 2. Les formes de la DM1
- Table 3. Exemple de mosaïcisme somatique d'un patient CDM suite à autopsie
- Table 4. Interacteurs potentiels des répétitions CUG dans le muscle des patients DM1
- Table 5. Ensemble des gènes connus dont l'épissage alternatif est altéré chez les patients DM1
- Table 6. Caractéristiques des différents types de fibres musculaires
- Table 7. Protéines impliquées dans la fusion des myoblastes des vertébrés
- Table 8. Tableau récapitulatif des gènes impliqués dans le développement cardiaque conservés entre *Drosophila* et vertébrés
- Table 9. Définition des degrés et types de blocs cardiaques
- Table 10. Manifestations cardiaques des patients DM1
- Table 11. Modèles de *Drosophila* de maladies neuromusculaires avec un apport pour l'homme ou les modèles mammifères
- Table 12. Récapitulatif des modèles de la DM1

Liste des abréviations

-A-

AMP	Précurseur du Muscle Adulte
ARNm	Acide ribonucléique messager
AV	Auriculo-ventriculaire

-B-

BIN1	Bridging integrator-1
Bru-3	Bruno-3
BRUNOL	Bruno-Like

-C-

CDM1	Dystrophie myotonique de type 1 congénitale
CLCN1	Chloride Channel Protein
CMD	Cardiomyopathie dilatée
CMH	Cardiomyopathie hypertrophique
CRM1	Chromosomal Maintenance 1
CTCF	CCCTC-binding factor
CUGBP1	CUG Binding Protein 1

-D-

DD	Diamètre diastolique
DGC	Dystrophin-associated Glycoprotein Complex
DM1	Dystrophie myotonique de type 1
DM2	Dystrophie myotonique de type 2
DMPK	Dystrophia Myotonica protein kinase
DMWD	Dystrophia Myotonica containing WD repeat motif
Dpp	Decapentaplegic
DS	Diamètre systolique

-E-

ECG	Electrocardiogramme
-----	---------------------

-F-

FC	Cellule fondatrice (du muscle)
FCM	Myoblaste compétent à la fusion
FR	Fraction de raccourcissement
FuRMAS	Fusion Restricted Myogenic Adhesive Structure

	-G-
GEF	Guanine-nucleotide Exchange Factor
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
	-H-
hcTNT	Human cardiac Troponin T
hnRNP H	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H
	-I-
ID	Intervalle diastolique
IR	Récepteur à l'insuline
IS	Intervalle systolique
	-K-
kDa	kilodalton
	-L-
lb	ladybird
	-M-
Mbl	Muscleblind
MBNL1	Muscleblind-like 1
MEC	Matrice Extra Cellulaire
miARN	micro Acide ribonucléique
MSH2	MutS Homolog 2
MSH3	MutS Homolog 3
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
	-P-
PARN	poly(A)-specific ribonuclease
PC	Cellule péricardiaque
PKC	Protéine kinase C
PKR	Protéine kinase R
pnr	pannier
polyAla	polyalanine
polyCys	polycystéine
polyGln	polyglutamine
polyLeu	polyleucine
polySer	polyserine
	-R-
RAR γ	Récepteur de l'Acide Rétinoïque γ
RRM	Motif de Reconnaissance de l'ARN (RNA Recognition Motif)

RS	Réticulum Sarcoplasmique
RYR1	Récepteur à la Ryanodine
	-S-
SERCA	Sarco/Endoplasmic reticulum Calcium-ATPase
SHARP	SMART/HDAC1 associated repressor protein
SIX5	Sin oculis homeobox homolog 5
Sp1	Specifity protein 1
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
svp	seven-up
	-T-
tin	tinman
Twi	Twist
	-V-
VD	Ventricule droit
VG	Ventricule gauche

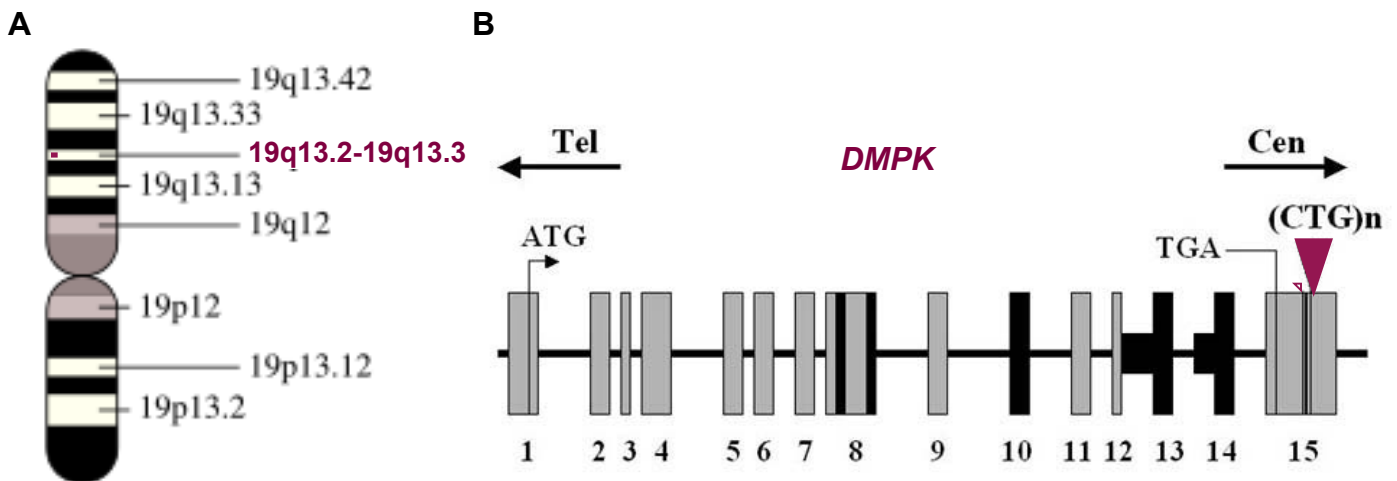
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

« Il n'y a pas de synthèse : il n'y a que le discontinu. »

Jules Renard, Extrait de son Journal 1893 - 1898

Table 1. Principaux symptômes des formes adultes de la DM1

Système	Manifestations cliniques
Système musculaire squelettique	Myotonie Faiblesse musculaire des muscles distaux puis plus tardivement des muscles proximaux, des muscles de la face, mâchoire, langue et des fléchisseurs du cou Fonte musculaire
Système musculaire lisse	dysphagie, aigreurs d'estomac, régurgitation, indigestion, ballonnement, constipation/diarrhée Contractions désordonnées de l'utérus lors de la parturition
Système cardiaque	Arythmie cardiaque Troubles de la conduction
Système respiratoire	Faiblesse et myotonie du diaphragme et des muscles respiratoires Anomalie de contraction du pharynx et de l'œsophage Hypoventilation alvéolaire
Système oculaire	Cataracte Ptôse Dégénérescence de la rétine
Système endocrinien	Insensibilité à l'insuline (différente du diabète de type 2) Hypercholestérolémie (Kaminsky et al., 2011) Hypertriglycéridémie (Kaminsky et al., 2011) Atrophie testiculaire Taux élevé de FSH Calvitie prématurée
Système nerveux	Retard mental Hypersomnie
Système immunitaire	Déficience en IgG (Kaminsky et al., 2011) Surproduction de TNFalpha



I. La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) et la mutation en cause dans cette pathologie

La Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1) est une maladie neuromusculaire multi-systémique autosomique dominante de pénétrance complète mais d'expression très variable d'un individu à l'autre. La DM1 est la dystrophie la plus courante chez l'adulte. Dans la littérature médicale, on lui attribue une prévalence globale de 1/8000 alors que l'observatoire des maladies rares (Orphanet) signale une prévalence globale de 1/20000. Dans certaines régions géographiques comme au Québec, elle atteint une prévalence de 1/530 (Yotova *et al.*, 2005).

1. La DM1, une maladie multi-systémique

La DM1 est décrite pour la première fois en 1909 par Hans Steinert (Steinert 1909). Steinert décrit la myotonie (difficulté du muscle à se relaxer après une contraction), la faiblesse musculaire et la ptôse (affaissement des paupières). Il remarque déjà que cette maladie n'est pas simplement une atteinte musculaire mais qu'elle affecte d'autres organes. La table 1 récapitule les principaux symptômes des formes adultes de la DM1.

2. Identification de la mutation à l'origine de la DM1

2.1. Une mutation non codante

Il aura fallu vingt années pour identifier la mutation à l'origine de la DM1. Il s'agit d'une amplification instable de triplets CTG dans la région 3' non traduite du gène *Dystrophia Myotonica Protein Kinase* ou *DMPK* (Brook *et al.*, 1992; Fu *et al.*, 1992; Mahadevan *et al.*, 1992) localisé sur le chromosome 19 (Figure 1).

La protéine DMPK est ubiquitaire mais particulièrement enrichie dans les organes atteints par la DM1 - muscles squelettiques distaux, muscles lisses, coeur, yeux, testicules, cortex cérébral et cervelet (Jansen *et al.*, 1996; Eriksson *et al.*, 2000; Sarkar *et al.*, 2004) - expliquant ainsi le caractère multi-systémique de cette pathologie.

Les répétitions non codantes mises en causes dans cette maladie sont responsables de la séquestration des transcrits mutés *DMPK* dans les noyaux des cellules musculaires des patients. Ces structures sont appelées *foci* (Davis *et al.*, 1997) et constituent aujourd'hui la

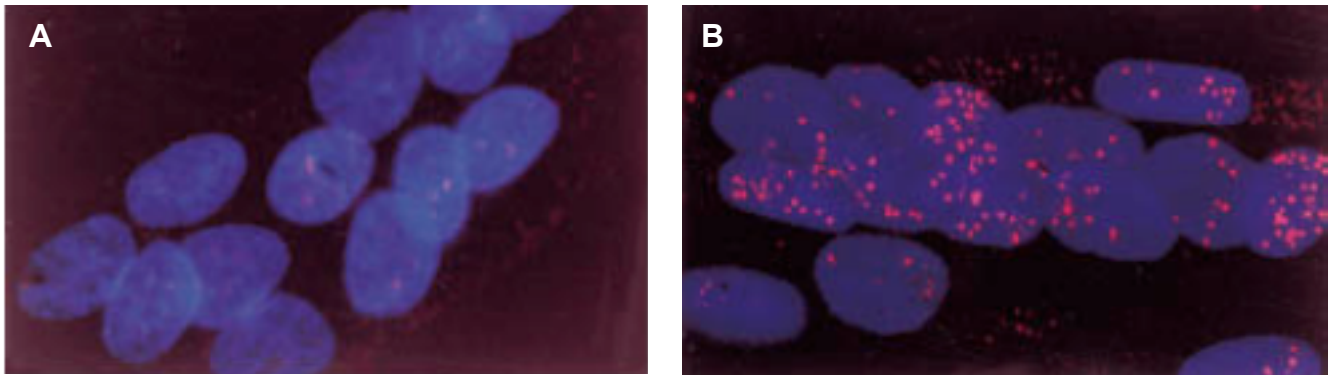


Figure 2. Visualisation des *foci* nucléaires dans les myoblastes de patients DM1

Les répétitions CUG de l'ARN *DMPK* mutant observable par hybridation *in situ* à l'aide d'une sonde $(CAG)_{30}$ -Cy3 sont représentées en rouge. Les noyaux des cellules sont marqués au DAPI. A=sujet sain, B=patient DM1

Davis *et al.*, 1997

Table 2. Les formes de la DM1

Forme de DM1	Nombre de répétitions CTG	Age d'apparition des premiers symptômes	Symptômes
Individu sain	5-37	-	-
Asymptomatique, tardif	37-49	Après 40 ans	Transmission à la descendance, pas de symptômes. Signes cliniques sont une cataracte et calvitie
Adulte	50-100	20-40 ans	Myotonie, dégénérescence musculaire, cataracte, troubles cardiaques, résistance à l'insuline
Juvenile / Infantile	100-1000	Avant 10 ans	Difficultés d'apprentissage, Hypersomnie, Hypotonie, Myotonie, Troubles de l'élocution et de la concentration
Congénitale (CDM1)	>1000	Dès la naissance	Hypotonie importante, troubles de la succion et de la déglutition, détresse respiratoire sévère, retard psychomoteur important pour les survivants

signature histopathologique de la DM1 (Figure 2). Ces inclusions ont été observées chez les patients DM1 dans des fibroblastes, le muscle squelettique (Taneja *et al.*, 1995; Davis *et al.*, 1997), dans le coeur (Mankodi *et al.*, 2005), ainsi que, au niveau cérébral, dans les neurones corticaux et sous corticaux (Jiang *et al.*, 2004). Bien que les foci soient essentiellement nucléaires, il faut noter qu'une distribution cytoplasmique a également été décrite (Amack and Mahadevan, 2001).

2.2. Corrélation génotype/phénotype : les formes de la DM1

Kroksmark et collègues ont analysé une cohorte de 42 enfants atteints de DM1 et montré une corrélation négative entre la taille des répétitions et la forme de la DM1 : plus le nombre de répétitions CTG dans le gène *DMPK* est important chez les patients, plus ceux-ci présentent un tableau clinique lourd et une précocité dans l'âge d'apparition de la maladie (Kroksmark *et al.*, 2005). Néanmoins, une modélisation plus récente faite à partir d'échantillons de 137 patients montre que l'âge d'apparition des premiers signes cliniques dépend à la fois de la taille initiale des répétitions dans les progéniteurs sous la limite d'un seuil de 200 CTG et du niveau d'instabilité somatique (Morales *et al.*, 2012).

Quatre formes cliniques de la DM1 ont tout de même été décrites (Table 2) selon l'âge d'apparition des premiers symptômes et leur sévérité : les formes congénitale, juvénile, adulte et tardive non asymptomatique. Le mécanisme moléculaire de la maladie (voir le chapitre « Pathogénèse de la DM1 ») ne permet pas d'établir ou d'observer une scission nette entre chacune de ces formes.

La forme congénitale est presque exclusivement à transmission maternelle (Harley *et al.*, 1993), probablement à cause de l'élimination des spermatozoïdes avec des tailles extrêmes d'expansions CTG (Jansen *et al.*, 1994). Bien souvent les enfants atteints de la forme congénitale décèdent à la naissance de détresse respiratoire. Lorsqu'ils survivent, ils présentent un retard psychomoteur important et les troubles présentés dans la Table 2. Pour les autres formes de la DM1, la détresse respiratoire est la première cause de décès des patients, mais les troubles du rythme cardiaque jouent également un rôle important.

3. Dynamisme de la mutation et conséquences

Chez un individu sain, la région 3' non traduite du gène *DMPK* contient entre 5 et 37 répétitions CTG. Chez les patients atteints de DM1, le nombre de répétitions est supérieur à 50 et peut atteindre plusieurs milliers dans les formes congénitales (Brook *et al.*, 1992). Le dynamisme de cette mutation est lié à son instabilité. En effet, ce nombre de répétitions pathologiques continue à augmenter au cours du temps chez les patients DM1 (Wong *et al.*, 1995; Lia *et al.*, 1998; Martorell *et al.*, 1998) tant au niveau des cellules somatiques qu'au niveau des cellules germinales (Savouret *et al.*, 2003; De Temmerman *et al.*, 2004).

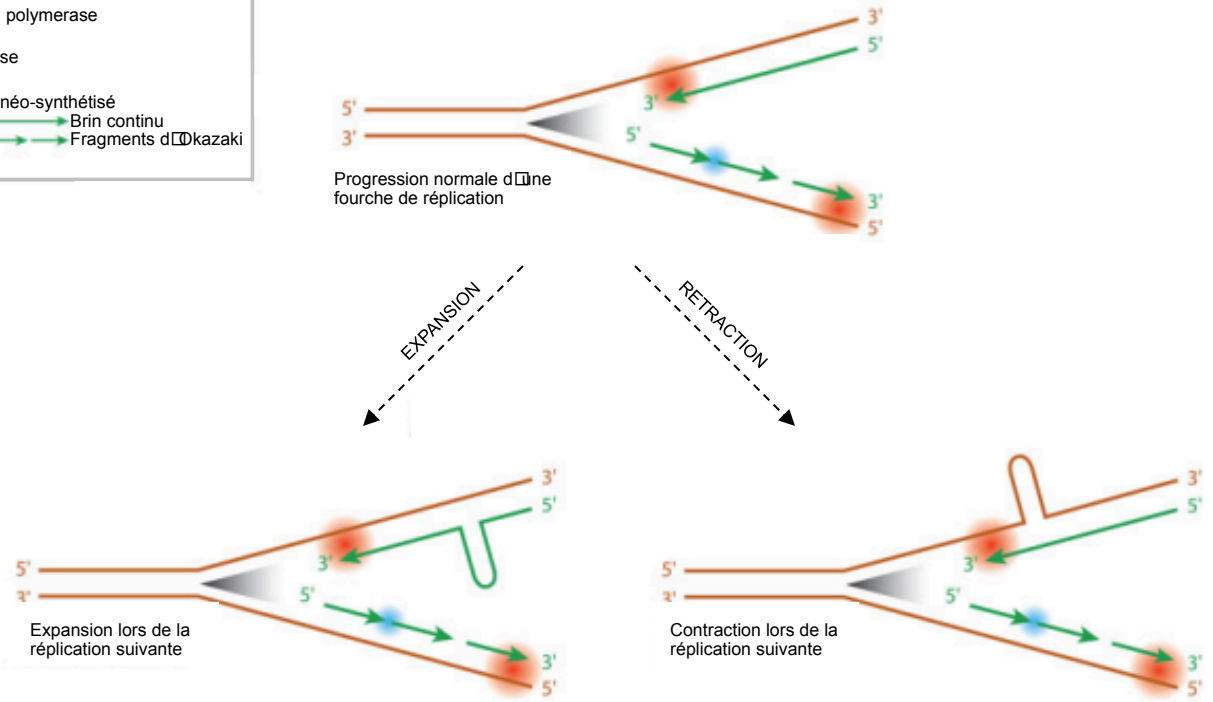
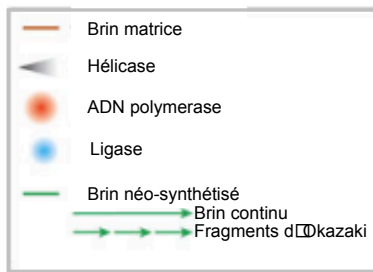


Figure 3. Instabilité des répétitions CTG au cours de la réplication

Au cours de la réplication normale, l'ADN polymérase synthétise l'ADN de façon continue à partir d'un brin parental (en haut) et de façon interrompue via les fragments d'Okazaki à partir du brin complémentaire (en bas). Des structures secondaires peuvent se former au niveau des expansions de triplets CTG soit sur le brin matrice (en orange) soit sur le brin néo-synthétisé (en vert). La formation de telles structures sur le brin néo-synthétisé engendre une expansion de répétitions qui se manifeste dès le cycle de réplication suivant. Au contraire, si cette structure secondaire se forme sur le brin matriciel elle engendre une contraction de ces répétitions.

Brouwer *et al.*, 2009

3.1. Mécanisme d'instabilité des répétitions

L'instabilité des répétitions dans la DM1 peut être associée à des erreurs au cours du métabolisme de l'ADN, dont la réplication, la réparation ou la transcription qui tous engendrent la séparation des deux brins d'ADN.

Dans un premier temps, la réplication a été suggérée comme étant la première responsable dans l'instabilité des répétitions selon le mécanisme présenté dans la figure 3. Ce mécanisme est basé sur la capacité des expansions CTG à former des structures secondaires de type tige-boucle (Mooers *et al.*, 2005). Brièvement, la formation d'une structure secondaire sur le brin néo-synthétisé lors de la réplication entraînerait une expansion des répétitions alors que sa formation sur le brin matriciel engendrerait une rétraction (Brouwer *et al.*, 2009). La contraction du nombre de répétitions CTG est un phénomène également observé chez les patients mais avec une faible fréquence de 6-7% (Kang *et al.*, 1995; Sarkar *et al.*, 1998; Iyer and Wells, 1999). Il a été montré sur des cellules en culture qu'en effet, l'instabilité des répétitions CTG est stimulée par la prolifération cellulaire (Nakamori *et al.*, 2010).

Cependant, la transcription peut également être un mécanisme pertinent de l'instabilité des répétitions pour trois raisons :

- l'expression des répétitions non-codantes ne silencie pas l'allèle muté (voir le chapitre « II.1. Effets en *cis* du gène muté de la DMPK ») (Krahe *et al.*, 1995)
- les organes affectés le plus sévèrement dans la DM1 sont ceux avec les taux les plus bas de division cellulaire mais l'expression la plus forte du gène *DMPK*
- les répétitions CTG du locus DM1 sont transcrites de manière bi-directionnelle (voir le chapitre « II.1. Effets en *cis* du gène muté de la DMPK ») (Cho *et al.*, 2005)

Ainsi, il a été démontré que la transcription stimule l'instabilité des répétitions CTG de manière dépendante de leur taille et que la transcription bidirectionnelle des répétitions CTG ne fait encore qu'aggraver leur expansion (Nakamori *et al.*, 2010).

Des variants de trinuécléotides interrompant l'expansion de triplets CTG ont été observés dans certains cas de DM1 (Leeflang and Arnheim, 1995; Musova *et al.*, 2009; Braida *et al.*, 2010). De manière intéressante, ces interruptions permettent soit la stabilisation des répétitions CTG (Leeflang and Arnheim, 1995 Braida *et al.*, 2010) soit sont hautement instables mais favorisent leur contraction (Musova *et al.*, 2009). Dans le cas d'une famille DM1 particulière, les variants CCG et CGG ont été associés aux symptômes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (Braida *et al.*, 2010). Autrement, le rôle de ces interruptions reste méconnu chez les autres patients (Musova *et al.*, 2009).

Table 3. Exemple de mosaïcisme somatique d'un patient CDM suite à autopsie (D'après Joseph et al., 1997)

Tissu	Nb de répétitions CTG dans le gène <i>DMPK</i>
Sang périphérique	2400
Muscle squelettique, Cerveau, Foie, Surrénale, Utérus	2650-2800
Coeur	2760 3220

3.2. Mosaïcisme somatique

L'instabilité somatique chez les patients dépend de leur âge et de la taille des répétitions CTG avec un biais vers une expansion plutôt qu'une rétraction. Cette instabilité résulte en un mosaïcisme inter et intra-tissulaire. En effet, le nombre de répétitions de trinucleotides entre les différents tissus d'un même patient (Table 3, Joseph *et al.*, 1997) est variable. Les organes affectés le plus sévèrement dans la DM1, qui ont donc les expansions les plus importantes, sont ceux qui expriment le plus fortement le gène *DMPK* (muscles squelettiques, cœur et cerveau).

Le nombre de répétitions peut également être divergeant au sein d'un même tissu (Seznec *et al.*, 2000). Ce phénomène de mosaïcisme intra-tissulaire semble prédominant dans le muscle, mais est également présent dans d'autres tissus comme le cerveau (Jinnai *et al.*, 2013).

3.3. Mosaïcisme gonadique et phénomène d'anticipation

Le tableau clinique de la DM1 est variable au sein d'une même famille. Cette observation s'explique par le phénomène d'anticipation, caractéristique clinique de cette maladie. Il s'agit de l'aggravation des symptômes / formes de la DM1 au sein d'une même famille au fur et à mesure de sa transmission entre générations. Ce phénomène d'anticipation est clairement lié à l'instabilité des répétitions dans les cellules germinales et donc au mosaïcisme gonadique.

Aussi, il a été constaté que la transmission de la mutation de la DM1 dépend de l'âge, mais également du sexe du parent transmetteur (Brunner *et al.*, 1993; Harley *et al.*, 1993). En effet, il semble que des expansions de petites tailles très instables sont transmises par le père, tandis que les grandes expansions liées aux formes congénitales sont préférentiellement dues à une transmission maternelle (Tsilfidis *et al.*, 1992; Harley *et al.*, 1993; Lavedan *et al.*, 1993). Bien qu'il existe quelques cas de formes congénitales de la DM1 transmises par le père (Zeesman *et al.*, 2002; Di Costanzo *et al.*, 2009) cela reste un évènement rare car il a été mis en évidence l'existence d'une sélection naturelle contre les spermatozoïdes avec des expansions CTG extrêmes dans la DM1 (Jansen *et al.*, 1994).

L'expansion des répétitions CTG dans les spermatogonies des souris DM1 se produit par un mécanisme dépendant de MSH2, composant majeur de la voie de réparation des mésappariements (Savouret *et al.*, 2003). En effet, les souris DM1 déficientes en MSH3 présentent un taux diminué d'évènements d'expansion (Foiry *et al.*, 2006). Récemment, il a été montré dans le modèle levure que la présence ou l'absence d'une structure de type boucle liée aux répétitions CTG va influencer le positionnement du complexe MSH2-MSH3 lors de la synthèse des fragments d'Okazaki et modifier l'action des enzymes Rad27 et Cdc9 impliquées

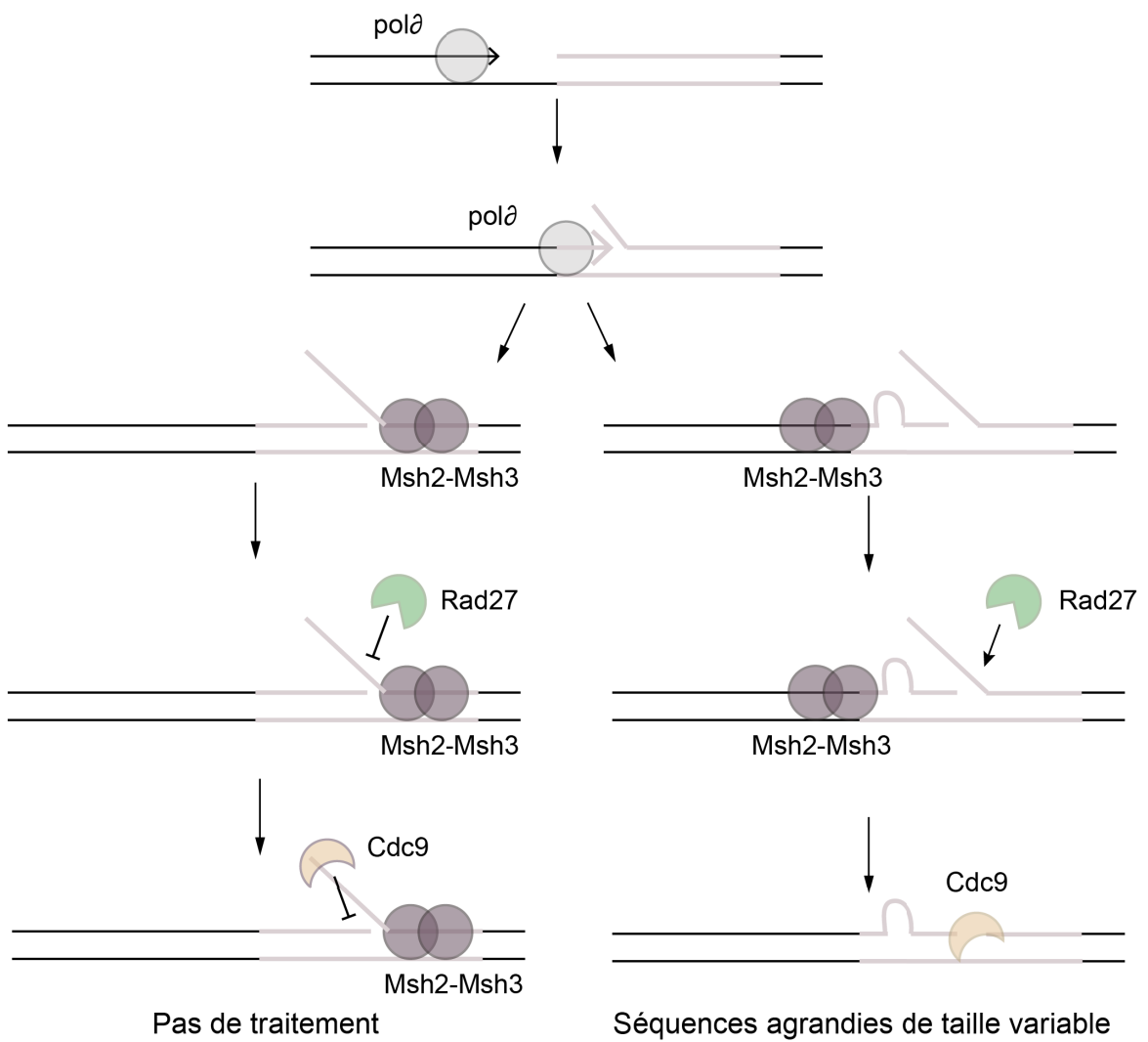


Figure 4. Instabilité des répétitions CTG au cours de la méiose

Au cours de la maturation normale des fragments d'Okazaki (à gauche), la polymérase θ atteint l'extrémité 5' du fragment d'Okazaki adjacent et entraîne le déplacement du brin. MSH2-MSH3 se lie à la base de l'extrémité 5' battante et inhibent Rad57 et Cdc9. Dans le cas où des répétitions CTG sont présentes et forment une structure secondaire (à droite), MSH2-MSH3 se lie à la boucle pour la stabiliser au niveau de la jonction des deux fragments d'Okazaki. L'extrémité 5' battante du fragment d'Okazaki adjacent est clivée à sa base par Rad27 créant un trou (« nick ») que Cdc29 comble.

dans cette synthèse, entraînant l'augmentation progressive de la taille des expansions CTG (Figure 4) (Kantartzis *et al.*, 2012).

En résumé, la mutation en cause dans la DM1 est dynamique avec une propension à l'expansion plutôt qu'à la rétraction. Son instabilité dans les tissus somatiques touche de nombreux systèmes et génère des symptômes variés. Dans la lignée germinale, l'instabilité est cause du phénomène d'anticipation.

II. Pathogénèse de la DM1

La découverte de la mutation à l'origine de la DM1 a permis de poser une question capitale: comment une mutation localisée dans une région non codante peut-elle générer la pathologie? Trois modèles physiopathologiques reliant l'expansion des triplets CTG aux symptômes cliniques de DM1 ont été proposés : (i) l'haplo-insuffisance en DMPK ; (ii) la diminution d'expression des gènes adjacents au gène *DMPK* ; (iii) le gain de fonction toxique de l'ARNm mutant qui reste le mécanisme prépondérant dans la DM1 et qui est le plus étudié.

1. Effets en *cis* du gène muté de la DMPK

1.1. Effet en *cis* de la mutation sur le gène *DMPK*

1.1.1. Haplo-insuffisance de la protéine DMPK

La DMPK est une sérine/thréonine kinase présentant des homologies de séquence avec les kinases de la famille Rho impliquées dans le trafic cellulaire et l'organisation du cytosquelette (Jin *et al.*, 2000; Ridley, 2001). Le gène codant cette protéine possède 15 exons et est épissé de façon alternative pour donner naissance à différentes isoformes dont la plus abondante est une isoforme de 80 kDa exprimée majoritairement dans les muscles squelettiques, lisses et cardiaque (Kaliman and Llagostera, 2008).

D'expression tout de même ubiquitaire, la protéine DMPK pourrait, par son absence, expliquer à elle seule le caractère multi-systémique de la DM1. C'est pourquoi, dans un premier temps, les études se sont portées sur l'hypothèse d'une haplo-insuffisance en protéine DMPK. Deux mécanismes ont été suggérés pour étayer cette hypothèse: (i) une altération de la transcription du gène *DMPK*, (ii) une rétention nucléaire du transcrit *DMPK* empêchant ainsi sa traduction dans le cytoplasme.

Pour ce qui est de la première hypothèse, bien qu'il ait été démontré qu'en contexte DM1 l'hétérochromatine s'étend au-delà des répétitions CTG (voir le chapitre « II.4.1.2. Hétérochromatisation du locus *DMPK* »), il semblerait que le niveau de transcription de l'allèle muté relativement à l'allèle sauvage reste normal (Krahe *et al.*, 1995). Ainsi la baisse de transcription du gène *DMPK* est infirmée. En revanche, la seconde hypothèse semble confirmée suite à l'observation d'agrégats ribonucléaires nommés *foci* et contenant les transcrits *DMPK* (Figure 2) (Taneja *et al.*, 1995). Par ailleurs, une baisse du niveau des transcrits et protéines DMPK a été observée dans les sujets atteints par la forme adulte de la

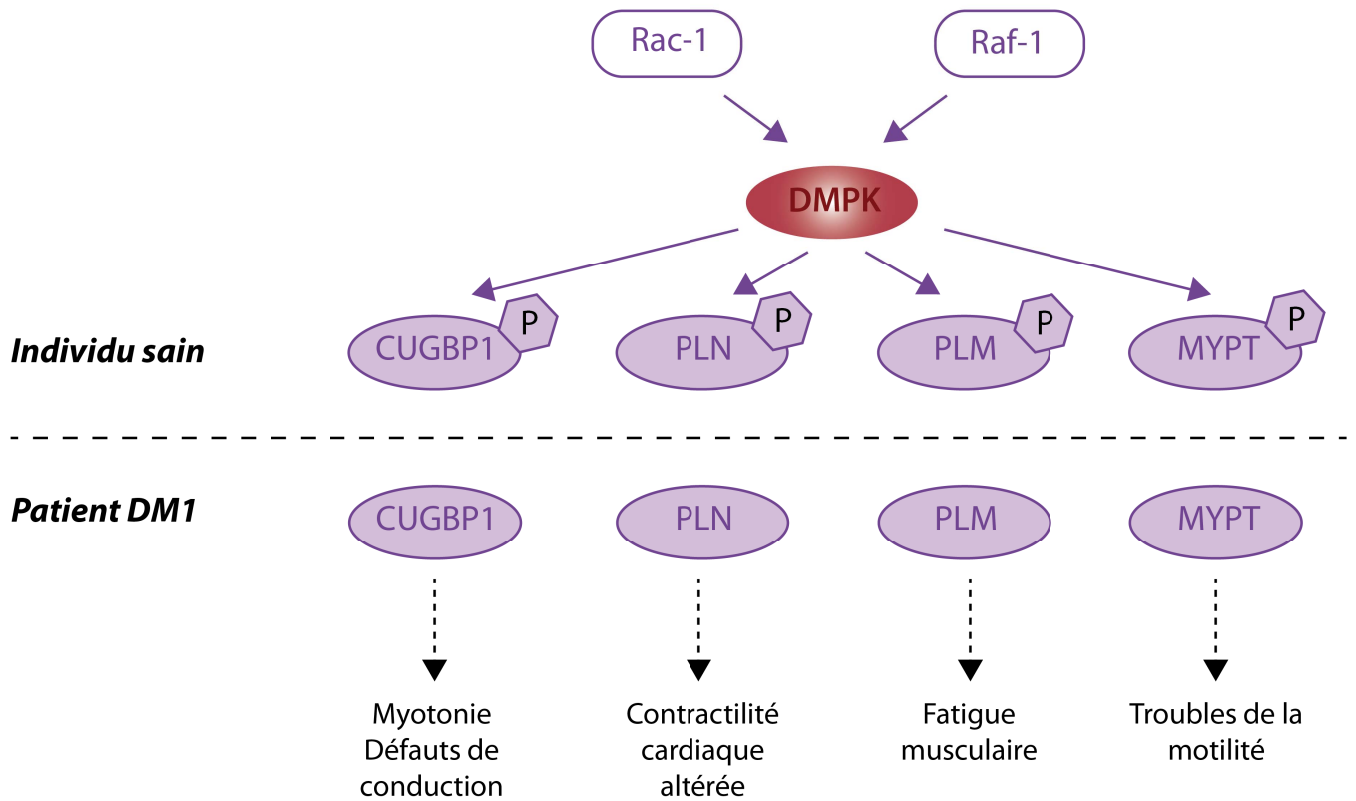


Figure 5. Modèle hypothétique du rôle de DMPK dans la DM1

L'activité kinase de la DMPK est induite par la liaison de la GTPase Rac-1 activée et de Raf-1 activé par Ras-1. Les récepteurs membranaires impliqués dans cette voie de signalisation sont inconnus. La phosphorylation des cibles de DMPK est corrélée à diverse altérations physiologiques observées dans les souris invalidées pour *Dmpk* et/ou dans la maladie humaine. CUGBP1, CUG-Binding Protein 1 ; PLN, Phospholamban ; PLM, phospholemman ; MYPT1 myosine phosphatase 1

DM1 (Fu *et al.*, 1993). Ainsi, il semblerait que les *foci* mènent à une baisse de la quantité de protéine, ayant pour conséquence une haplo-insuffisance en DMPK.

Afin d'analyser la conséquence de l'haplo-insuffisance en DMPK, l'inactivation du gène *DMPK* a été réalisée sur un modèle murin. Singulièrement, les souris invalidées pour le gène *Dmpk* (souris *Dmpk*^{-/-}) présentent des phénotypes atténués de la DM1 (Jansen *et al.*, 1996) dans les muscles squelettiques. En revanche, au niveau du cœur, les souris *Dmpk*^{-/-} exhibent des blocs atrio-ventriculaires de premier voire de troisième degrés accompagnés de défauts sévères de la conduction atrio-ventriculaire (Berul *et al.*, 1999). Enfin, sur un plan métabolique, les souris *Dmpk*^{-/-} présentent un niveau plus élevé de glucose dans le sang associé à une hypertrophie des adipocytes lorsque les souris sont soumises à un régime gras (Llagostera *et al.*, 2007) suggérant que *DMPK* est un gène de susceptibilité du diabète de type 2.

Des études plus approfondies ont été réalisées pour mieux appréhender la fonction de DMPK afin de comprendre les conséquences de son haplo-insuffisance. DMPK est une kinase mais bien peu d'éléments sont connues quant aux voies de signalisation dans lesquelles elle pourrait être impliquée. Cependant, il a été montré dans un système cellulaire que DMPK interagit avec les Rac1 et Raf-1 permettant son activation (Shimizu *et al.*, 2000). Par ailleurs, plusieurs cibles de DMPK, communes avec la PKC, ont également été identifiées (Figure 5). Il s'agit de phospholemman, un partenaire et régulateur de la pompe Na⁺-K⁺ dans le cœur et les muscles squelettiques (Mounsey *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2005; Silverman *et al.*, 2005). Phospholamban, un régulateur de l'activation de SERCA2 dans le cœur est également une cible de DMPK (Kaliman *et al.*, 2005). Enfin, DMPK phosphoryle la myosine phosphatase-1 inhibant son activité, ce qui a pour conséquence une augmentation de la phosphorylation de la chaîne légère de myosine (Muranyi *et al.*, 2001). Plus récemment, il a été mis en évidence en culture cellulaire que DMPK semble avoir un rôle dans l'intégrité de l'enveloppe nucléaire (Harmon *et al.*, 2011).

Ainsi, l'haplo-insuffisance en DMPK participe aux phénotypes pathologiques observés au niveau cardiaque et métabolique dans la DM1 mais ne récapitule pas toutes les facettes de la maladie (notamment au niveau du muscle squelettique), suggérant que d'autres mécanismes sont nécessairement impliqués dans la pathologie.

1.1.2. Traduction non-ATG dépendante des transcrits sens et anti-sens et protéotoxicité

Le locus *DMPK* comportant les répétitions CTG est transcrit de manière bidirectionnelle donnant naissance à un transcrit avec des répétitions CTG et un transcrit avec des répétitions CAG (Cho *et al.*, 2005). Il a été montré en culture cellulaire que les expansions de répétitions CTG ou CAG sont traduites de manière ATG-indépendante dans les trois cadres de lecture possibles. Ainsi, le transcrit sens comportant les répétitions CTG peut être traduit en polyLeu, polyAla et polyCys, alors que le transcrit antisens portant des répétitions CAG est traduit de

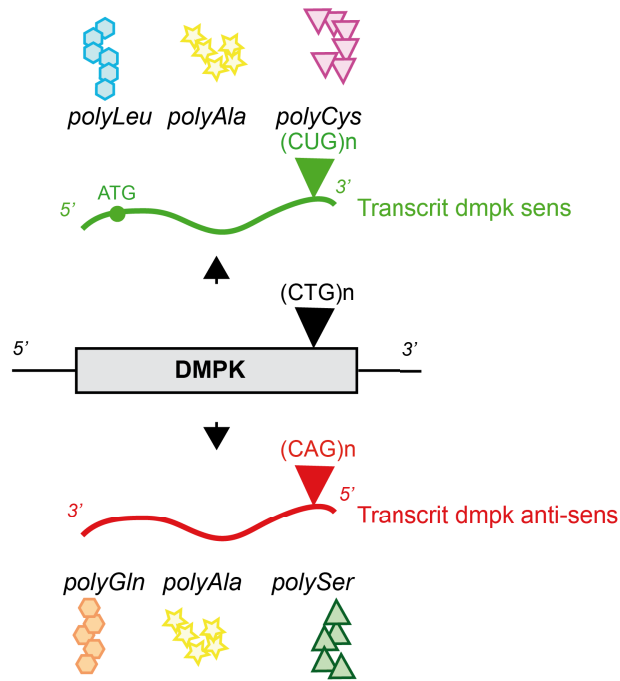


Figure 6. Traduction ATG-indépendante des répétitions dans la DM1

Les transcrits sens et anti-sens de *DMPK* pourraient être traduits de manière indépendante du site ATG de traduction dans tous les cadres de lecture possibles générant des homopolymères potentiellement toxiques pour la cellule.

d'après Sicot *et al.*, 2011

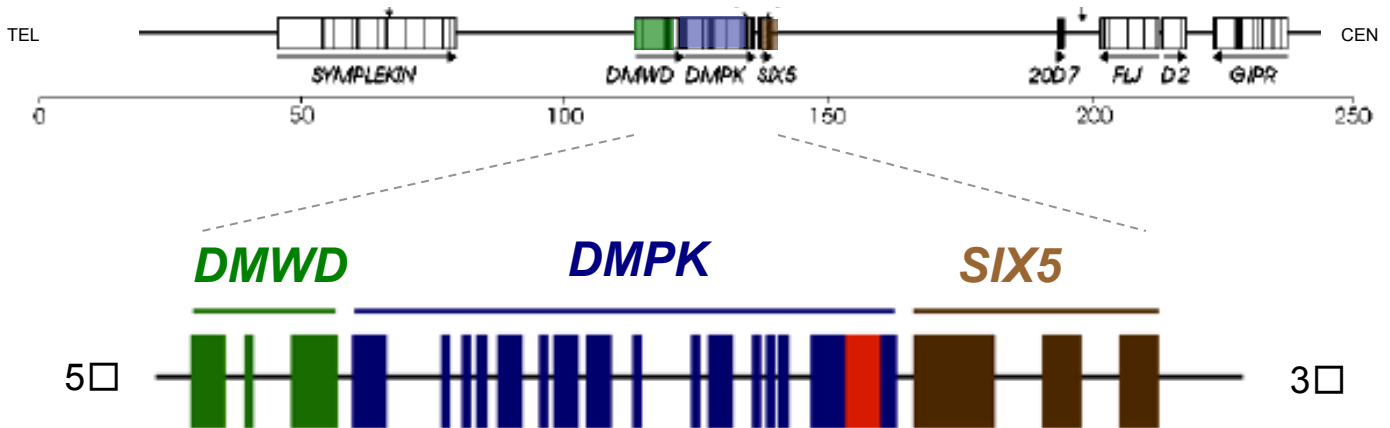


Figure 7. Organisation du locus *DMPK*

Le gène *DMPK* est flanqué du gène *DMWD* (*Dystrophia Myotonica containing WD repeat motif*) à son extrémité 5' (direction télomère) et du gène *SIX5* (*Sine oculis homeobox homolog 5*) à son extrémité 3' (direction centromère). Du fait de l'expansion des répétitions CTG dans le gène *DMPK*, il a été suggéré la possibilité d'une hétérochromatisation de ces gènes.

d'après Filippova *et al.*, 2001

manière robuste en polyGln, polyAla et polySer dans une moindre mesure (Figure 6) (Zu *et al.*, 2011).

La traduction ATG-indépendante suggère une protéotoxicité des peptides engendrés par les répétitions. Dans le modèle de souris DMSXL, des agrégats nucléaires polyGln dans les myocytes cardiaques sont détectables mais rares (Zu *et al.*, 2011). Dans des échantillons de patients DM1 avec 50-70 répétitions de triplets, des inclusions de polyGln ont été détectées à basse fréquence dans les myoblastes et les fibres des muscles squelettiques et à plus forte fréquence dans le sang (Zu *et al.*, 2011). Ainsi, la traduction ATG-indépendante intervient bien dans la pathogénèse de la DM1 mais à faible échelle. Il reste à déterminer quelles sont les conséquences de cette protéotoxicité chez les patients.

1.2. Effet en *cis* de la mutation sur le locus *DMPK*

La seconde hypothèse explorée a été celle d'une modification de la structure de la chromatine pouvant affecter l'expression du gène *DMPK*, mais également des gènes environnants *DMDW* (*Dystrophia Myotonica containing WD repeat motif*) et *SIX5* (*Sine oculis homeobox homolog 5*) (Frisch *et al.*, 2001).

1.2.1. Hétérochromatinisation du locus *DMPK* par les expansions CTG

Le locus *DMPK* est en réalité constitué de trois gènes très proches les uns des autres (Figure 7). En effet, l'extrémité terminale 3' du gène *DMWD* chevauche la région promotrice du gène *DMPK* (Shaw *et al.*, 1993). Par ailleurs, les répétitions CTG de la région non codante du gène *DMPK* s'interrompent au niveau du promoteur du gène *SIX5* (Boucher *et al.*, 1995). Bien que très proches, ces gènes ne présentent pas de profils d'expression similaires, indiquant qu'en condition normale, ils sont régulés indépendamment les uns des autres. Ceci est permis par la présence de sites de liaison à la protéine à doigts de zinc CTCF de part et d'autre des répétitions CTG (Filippova *et al.*, 2001). Il a été montré que sur l'allèle *DMPK* sain, les protéines CTCF se fixent à leur site de liaison limitant, par leur présence physique, la méthylation de la lysine 9 des histones H3 aux nucléosomes associés aux répétitions CTG (Cho *et al.*, 2005). Par ailleurs, les sites CTCF restreignent également la transcription anti-sens des répétitions CTG qui permet la génération de fragments de 21 nucléotides (Cho *et al.*, 2005). Dans le cas de l'allèle muté des formes congénitales mais aussi adultes, le locus *DMPK* est méthylé au niveau des îlots CpG notamment sur le premier site CTCF en amont des répétitions (Steinbach *et al.*, 1998; Lopez Castel *et al.*, 2011). De fait, les protéines CTCF ne se lient plus à leur site de fixation permettant la propagation de l'hétérochromatine normalement limitée aux répétitions, le long du locus (Otten and Tapscott, 1995; Cho *et al.*, 2005; Lopez Castel *et al.*, 2011). Une étude récente suggère que les méthylations des îlots CpG et la fixation de la protéine CTCF pourraient contribuer à l'instabilité somatique observée chez les patients (Cleary *et al.*, 2009).

1.2.2. Conséquences sur l'expression de *DMWD* et *SIX5*

Comme la structure chromatinienne à proximité des répétitions CTG du gène *DMPK* est anormalement condensée au niveau de l'allèle muté (Otten and Tapscott, 1995), il se peut que l'efficacité de la transcription de ce locus soit altérée. Alors que la diminution de la quantité de transcrits *DMPK* a été confirmée à plusieurs reprises (Fu *et al.*, 1993; Hamshere *et al.*, 1997; Eriksson *et al.*, 2001; Frisch *et al.*, 2001; Furling *et al.*, 2001b) il n'en va pas de même pour les gènes *DMWD* et *SIX5*. Effectivement, les niveaux de transcrits de *DMWD* et *SIX5* ont été montrés diminués par de nombreuses études (Klesert *et al.*, 1997; Thornton *et al.*, 1997; Alwazzan *et al.*, 1999; Korade-Mirnic *et al.*, 1999; Inukai *et al.*, 2000; Frisch *et al.*, 2001) mais inchangés dans le cadre d'une autre analyse (Hamshere *et al.*, 1997).

SIX5 (également connu sous les noms de *BOR2* ou *DMAHP*) code pour un facteur de transcription à homéodomaine qui semble jouer un rôle dans l'organogénèse. Chez l'homme, *SIX5* s'exprime dans les muscles squelettiques et le système nerveux central (Boucher *et al.*, 1995). Dans des myoblastes sains en culture, il a été montré que la déplétion de *SIX5* reproduit la baisse du niveau de 28 transcrits observée dans des myoblastes de patients DM1 (Dansithong *et al.*, 2011). L'inactivation du gène *Six5* chez la souris n'affecte pas le système musculaire mais est responsable de cataracte (Klesert *et al.*, 2000; Sarkar *et al.*, 2000). Cependant, ce type de cataracte est différent de celui retrouvé chez les patients DM1, ne présentant ni opacité iridescente, ni localisation sous-capsulaire postérieure. Par ailleurs, il a été montré que les souris *Six5*^{-/-} présentent un retard de conduction dans le cœur au niveau du faisceau de His comme observé chez les patients DM1 (Wakimoto *et al.*, 2002). Chez *Drosophila melanogaster*, l'orthologue de *SIX5* est *D-six4*. *D-six4* est requis pour la formation des gonades, de fait, les mutants présentent une importante atrophie testiculaire ou réduction ovarienne (Kirby *et al.*, 2001). De plus, *D-six4* est également impliqué chez l'embryon dans la fusion des myoblastes pour former les myotubes (Kirby *et al.*, 2001). Ce modèle suggère donc l'implication de *SIX5* dans la stérilité ou le défaut de fusion des myoblastes observés chez les patients DM1. Dans le modèle *C. elegans*, l'orthologue de *SIX5* est *unc-39*. Les mutants *unc-39* présentent souvent un nombre diminué de cellules musculaires suggérant que la mutation affecte la spécification des muscles des parois (Yanowitz *et al.*, 2004).

L'implication de *DMWD* (ou gène 59) dans la DM1 reste à déterminer car très peu d'éléments sont connus à son sujet. *DMWD* s'exprime dans les testicules et le cerveau. Un rôle dans l'atteinte neurale observée chez les patients a été suggéré (Westerlaken *et al.*, 2003).

2. Effets en *trans* du transcrit muté *DMPK*

La dystrophie myotonique de type 2 (DM2) est également une maladie autosomale dominante due à l'amplification de quadruplets CCTG dans l'intron 1 du gène *ZNF9* (Liquori *et al.*, 2001). Bien que les patients DM2 présentent des tailles de répétitions beaucoup plus importantes que les patients DM1, leurs symptômes bien que semblables sont moins sévères que dans la DM1. Le rôle des protéines *DMPK* et *ZNF9* étant bien différent, il existe donc un mécanisme en partie commun à ces deux pathologies, suggérant un effet en *trans* des répétitions non codantes appelé gain de fonction de l'ARN. L'implication du rôle des répétitions non codantes dans la pathologie a été validée grâce à des modèles murins exprimant environ 200 répétitions CTG sous contrôle du promoteur de la *β -actine* et reproduisant les phénotypes principaux de la DM1 (Mankodi *et al.*, 2000; Seznec *et al.*, 2001).

2.1. Effets sur des facteurs de transcription

Il a été montré que l'expression de facteurs de transcription est perturbée de différentes manières par l'expression des répétitions non codantes.

2.1.1. Phénomène de « leaching » des facteurs de transcription

Dès l'identification des *foci* dans les noyaux de cellules musculaires de patients, il était déjà envisagé la possibilité d'une interaction entre les répétitions CTG non codantes et des protéines sans relation avec *DMPK* (Davis *et al.*, 1997).

En effet, cinq ans plus tard, une étude réalisée sur des cultures cellulaires C2C12 suggère que le facteur de différenciation musculaire MyoD interagit avec le transcrit muté *DMPK*. En conséquence, la quantité disponible de protéines MyoD dans ces cellules est diminuée malgré un niveau et une stabilité normaux des transcrits *MyoD* (Amack *et al.*, 2002).

Une seconde étude sur des lignées cellulaires obtenues de patients DM1 montre que les facteurs de transcription Sp1 (Specificity protein 1), RAR γ (Retinoic acid receptor gamma), STAT1 et STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) sont captés par le compartiment ribonucléoprotéique des *foci* mais pas séquestrés. L'auteur a nommé ce phénomène « leaching » (Ebralidze *et al.*, 2004). Néanmoins, un regard critique peut être porté sur ce résultat qui n'a pas été reproduit dans les neurones corticaux par l'équipe de Charles Thornton (Jiang *et al.*, 2004).

2.1.2. Exclusion nucléaire du facteur de transcription SHARP

SHARP (SMART/HDAC1- associated repressor protein) est un facteur de transcription qui intervient dans un complexe multiprotéique activateur ou répresseur de la transcription (Shi

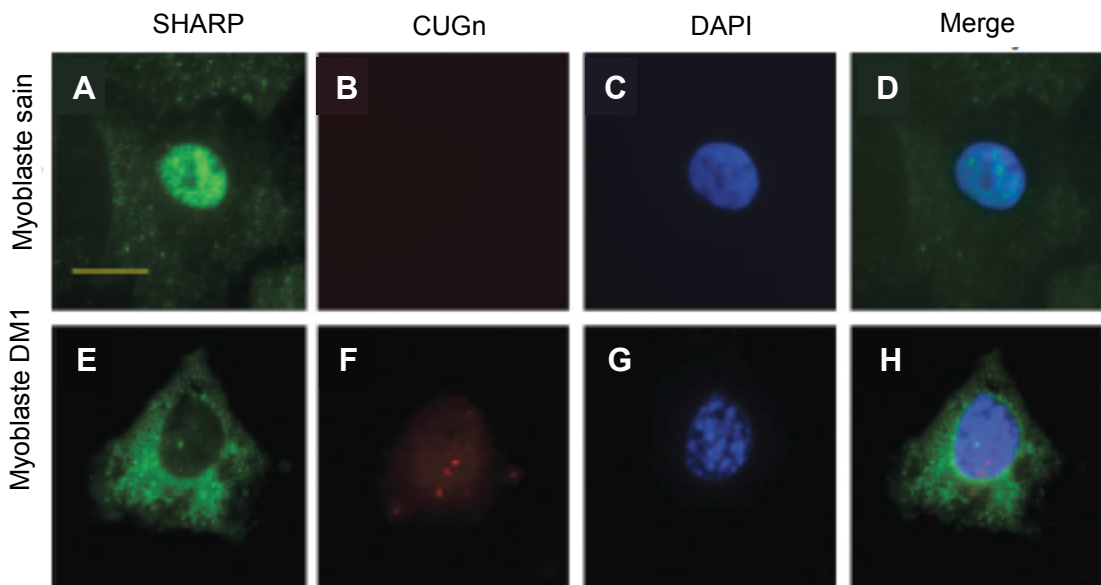


Figure 8. Distribution anormale de SHARP dans les myoblastes DM1

SHARP endogène est montré en vert. Les *foci* nucléaires sont détectés par hybridation *in situ* en fluorescence dans les myoblastes DM1 (F). Les noyaux sont marqués avec du DAPI (C, G). Les images superposées montrent que SHARP endogène est nucléaire dans les myoblastes normaux (A) alors qu'il est principalement cytoplasmique dans les lignées DM1 (E).

Dansithong *et al.*, 2011

et al., 2001). Il a été montré que dans la DM1, le facteur de transcription SHARP est exclu du noyau par une activité accrue de son export nucléaire médié par navette nucleo-cytoplasmique CRM1 (Figure 8) (Dansithong *et al.*, 2011). Il semblerait que cette activité accrue ne soit pas due à une augmentation de la quantité de CRM1 mais à une modification de la structure de SHARP par les répétitions qui modifierait son interaction avec CRM1. L'inactivation de SHARP dans des myoblastes sains reproduit la baisse d'expression de 25 transcrits observée dans des myoblastes DM1 (Dansithong *et al.*, 2011).

2.1.3. Expression ectopique de NKX2.5 dans les noyaux des muscles squelettiques

NKX2.5 est un facteur de transcription cardiaque régulant l'expression des connexines et participant au bon maintien d'une conduction cardiaque normale. Une expression ectopique de NKX2.5 a été détectée dans les muscles squelettiques des patients DM1 (Yadava *et al.*, 2008) accompagnée d'une expression ectopique des cibles de ce facteur (*NPPA* (*natriuretic peptide A*) et *NPPB* (*Brain natriuretic peptide*)). Dans le modèle de souris DM1, Nkx2.5 est bien surexprimé dans le cœur et cela est accompagné d'une diminution de l'expression de la connexine CX43. Ceci pourrait expliquer les défauts de conduction cardiaque observés dans ce modèle (Yadava *et al.*, 2008).

La communauté scientifique travaillant sur la DM1 n'a jamais réussi à reproduire ces résultats avec Nkx2.5 (communication personnelle de N. Charlet). Par ailleurs, une autre étude montre que l'expression de CX43 est augmentée au niveau protéique suite à une dérégulation des miARNs (Rau *et al.*, 2011) (voir « II.2.5.1. Implication des miARNs dans la DM1 ») et non affectée au niveau transcriptionnel.

2.2. Activation des kinases

Il a été observé à trois reprises que les répétitions non codantes permettent d'activer de manière directe ou indirecte des kinases.

En effet, il a été montré *in vitro* que les répétitions de trinuécléotides, qui forment une structure secondaire, activent la protéine kinase PKR en se liant à son domaine de liaison avec les ARN double-brin (Tian *et al.*, 2000). De ce fait, la PKR s'autophosphoryle ce qui pourrait avoir pour conséquence l'inhibition de la synthèse protéique *via* sa capacité à phosphoryler le facteur de traduction eIF2 α . Cependant, le sauvetage d'un modèle murin de la DM1 par une invalidation fonctionnelle de PKR n'a pas permis d'améliorer les phénotypes histologiques (Mankodi *et al.*, 2003).

Par ailleurs, les PKC α et β II sont également suractivées dans la DM1 par hyperphosphorylation (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007). Le mécanisme à l'origine de cette hyperphosphorylation est encore inconnu bien que probablement un effet secondaire de l'expression des répétitions non codantes. En revanche, les conséquences de l'hyperactivation

Table 4. Interacteurs potentiels des répétitions CUG dans le muscle des patients DM1 (D'après Laurent *et al.*, 2012)

Fonction protéique	Protéines liant les répétitions CUG
Protéine de liaison à l'ARN et HnRNP	- hnRNP M - nucleolin
Protéine de liaison au double-brin	- NFAR
Dégradation de l'ARN	- PmlScI-100
DEAD-box	- DDX5/p68 - DDX17/p72
Facteur d'épissage	- CDC5L
EJC	- UAP56
Recombinaison	- PARP1 - XRCC1

de la PKC sont très étudiées et elles seront développées ultérieurement dans le paragraphe « II.2.3.1. Stabilisation du facteur d'épissage CUGBP1 ».

Récemment, il a été mis en évidence sur des biopsies de muscle de patients DM1 ainsi que dans les muscles des souris modèles de la DM1 *HSA^{LR}* que la kinase GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) est activée dans les conditions pathologiques par une hypophosphorylation de sa Ser9 (Jones *et al.*, 2012). De ce fait, elle dérégule à son tour l'activité de la cycline D3 également impliquée dans la pathologie (voir le paragraphe « II.2.4. Altération de la stabilité des transcrits et de la traduction »). Une étude réalisée sur des progéniteurs de cellules neurales dérivés de patients DM1 montre également l'activation de GSK3 β par hypophosphorylation de sa Ser9 dans ce type cellulaire (Denis *et al.*, 2013). L'autophagie accrue observée dans ces cellules progénitrices est associée à une baisse de la signalisation de mTOR de manière dépendante de la diminution de disponibilité de MBNL1 (Denis *et al.*, 2013).

2.3. Altération de l'épissage alternatif

Suite à l'observation de *foci* dans les noyaux exprimant les répétitions non codantes (Taneja *et al.*, 1995; Davis *et al.*, 1997), rapidement il a s'agit d'identifier des interacteurs protéiques de ces répétitions capables de former des structures secondaires similaires à un ARN double-brin de forme A avec des mésappariements U-U (Mooers *et al.*, 2005). Cette thèse est soutenue par les similarités phénotypiques entre la DM1 et la DM2 qui pourraient ainsi présenter un mécanisme commun de pathogénèse via un effet *trans*-dominant de leurs répétitions non codantes CUG ou CCUG. Récemment, une chromatographie d'affinité a permis d'identifier de nouveaux interacteurs des répétitions CUG *in vitro* (Table 4) (Laurent *et al.*, 2012). Leur interaction *in vivo* avec les répétitions CUG ainsi que leur implication dans la pathologie restent encore à valider.

Auparavant, plusieurs études ont permis d'identifier un effet des répétitions sur des facteurs d'épissage parmi lesquels la famille Muscleblind (Miller *et al.*, 2000; Fardaei *et al.*, 2002), les facteurs de la famille CELF (CUGBP1) (Timchenko *et al.*, 1996a; Timchenko *et al.*, 2001a; Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007) et hnRNP H (Timchenko *et al.*, 1996b).

2.3.1. Stabilisation du facteur d'épissage CUGBP1

CUGBP1 est une protéine de la famille CELF (CUG-BP and ETR-3 Like Factors), initialement nommée BRUNOL (Bruno-Like) pour son homologie avec le facteur régulateur de la traduction Bruno décrit chez la Drosophile (Good *et al.*, 2000). Les membres de la famille CELF interviennent à de nombreux niveaux dans la régulation post-transcriptionnelle des ARNs : épissage alternatif (Philips *et al.*, 1998; Ladd *et al.*, 2001; Ladd *et al.*, 2004), régulation de la traduction (Timchenko *et al.*, 1999; Iakova *et al.*, 2004), déadénylation et dégradation des ARNs (Paillard *et al.*, 2003; Vlasova *et al.*, 2008; Le Tonqueze *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010;



Figure 9. Absence de co-localisation du facteur d'épissage CUGBP1 dans les *foci* nucléaires

La présence de *foci* CUG n'altère pas la localisation de la protéine CUGBP1 qui reste diffuse dans le nucléoplasme.

Mankodi *et al.*, 2003

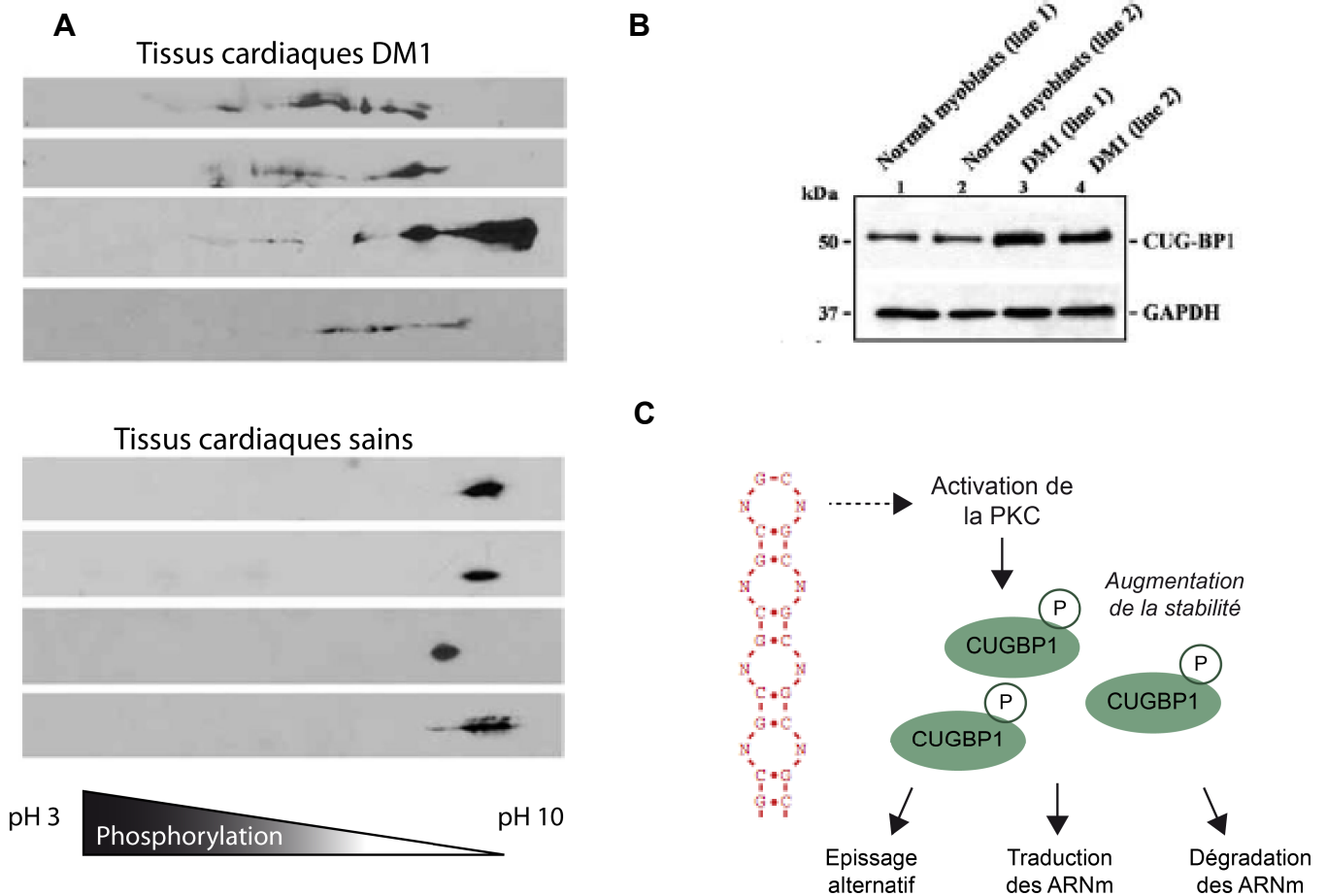


Figure 10. Stabilisation du facteur d'épissage CUGBP1 par la PKC

A) La protéine CUGBP1 est hyperphosphorylée dans le tissu cardiaque des patients DM1 par opposition au tissu cardiaque sain. B) Ce Western Blot montre que dans les myoblastes DM1, la protéine CUGBP1 est en quantité plus importante que dans les myoblastes normaux. C) Le modèle de stabilisation de la protéine CUGBP1 par la PKC dans les tissus musculaires et cardiaque des patients DM1. Le mécanisme d'activation de la PKC en contexte DM1 reste inconnu.

Kuyumku-Martinez *et al.*, 2007

Rattenbacher *et al.*, 2010) et édition des ARNs (Anant *et al.*, 2001). Les protéines CELF possèdent trois domaines RRM de liaison à l'ARN. Par ailleurs, elles possèdent également une région linker unique qui sépare les domaines RRM2 et RRM3 appelée domaine divergent. Ce domaine est dit divergent car il permet de classer les protéines CELF en deux sous-familles distinctes (Ladd *et al.*, 2001).

Les domaines RRM des protéines CELF permettent de reconnaître spécifiquement les motifs riches en U/G (Philips *et al.*, 1998; Savkur *et al.*, 2001; Charlet *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2008) et en particulier, les motifs UGUU (Faustino and Cooper, 2005; Marquis *et al.*, 2006). CUGBP1 ayant deux domaines RRM successifs, il peut reconnaître le motif GUUGUUUUUGUU (Teplova *et al.*, 2010).

CUGBP1 est fortement exprimé dans le muscle (Ladd *et al.*, 2001). Dans un tout premier temps, CUGBP1 a été identifié *in vitro* comme interacteur des répétitions CUG simple brin (Timchenko *et al.*, 1996a). Cependant, aucune co-localisation de CUGBP1 avec les *foci* n'a jamais pu être observée. D'ailleurs, le laboratoire de Charles Thornton a mis en évidence que CUGBP1 est présent de manière diffuse dans les noyaux des cellules musculaires DM1 (Mankodi *et al.*, 2003) (Figure 9).

En réalité, CUGBP1 est soumis à plusieurs altérations dans la DM1. A commencer par sa phosphorylation. Dans un premier temps, il a été mis en évidence que CUGBP1 était une cible de la kinase DMPK et que par conséquent la protéine était hypophosphorylée tant dans les cellules en culture issues de patients DM1 que dans le cœur et les muscles squelettiques des souris *Dmpk*^{-/-}. L'hypophosphorylation de CUGBP1 mène à une translocation de la protéine du cytoplasme vers le noyau (Roberts *et al.*, 1997). Par la suite, il a été montré que le niveau de CUGBP1 est augmenté dans les muscles squelettiques et le cœur des patients DM1 ou des souris transgéniques exprimant DMPK mutée (Savkur *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007; Orengo *et al.*, 2008), grâce à son hyperphosphorylation par les PKC α et β II (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007) (Figure 10).

Plusieurs évidences valident l'implication de CUGBP1 dans la physiopathologie de la DM1. Tout d'abord, la surexpression de *CUGBP1* dans les muscles squelettiques de souris reproduit plusieurs caractéristiques histologiques et moléculaires de la DM1 (Ward *et al.*, 2010). Par ailleurs, dans le cœur de souris, la surexpression de *CUGBP1* cause une cardiomyopathie dilatée, une conduction anormale et des défauts moléculaires propres à la DM1 (Koshelev *et al.*, 2009). Ces défauts, également observés dans le cœur des souris DM1 (Wang *et al.*, 2007), peuvent être atténués par l'inhibition de la PKC (Wang *et al.*, 2009). Enfin, dans le modèle de DM1 de Drosophile, la surexpression de la protéine CUGBP1 humaine aggrave les phénotypes de dégénérescence oculaire et de perte musculaire (de Haro *et al.*, 2006).

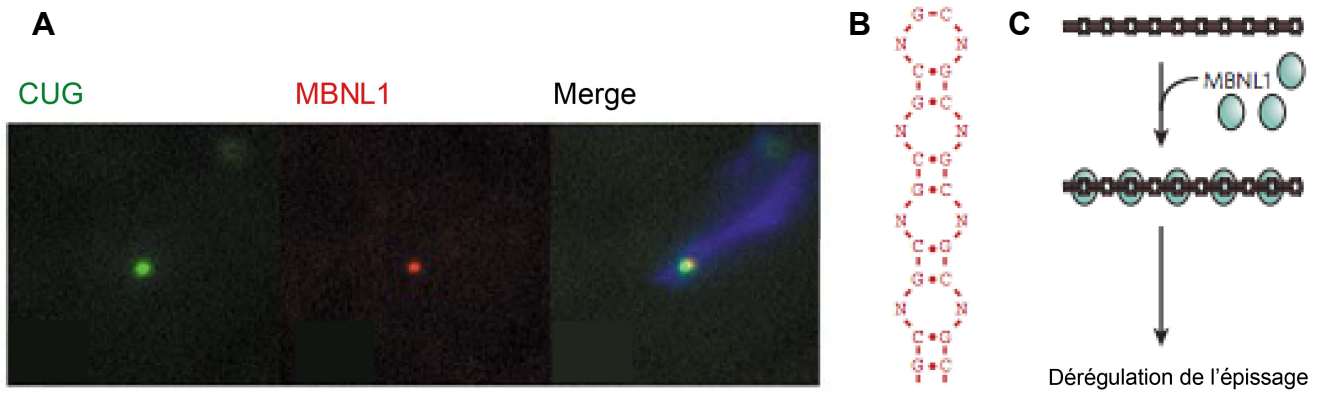


Figure 11. Séquestration du facteur d'épissage MBNL1 dans les *foci* nucléaires

A) Co-localisation de MBNL1 avec les expansions CUG dans des tissus musculaires de patients DM1. MBNL1 (en rouge) est détecté par immunomarquage en fluorescence. Les expansions CUG (en vert) sont visualisées par hybridation *in situ* en fluorescence. Le noyau est marqué au DAPI. B) Les expansions CUG (tout comme les expansions de type CNG) forment une structure en épingle à cheveux stable. C) Le modèle de la séquestration de la protéine MBNL1 par les expansions CUG à l'origine des défauts d'épissage alternatif dans la DM1.

Mankodi *et al.*, 2001; Mirkin *et al.*, 2007

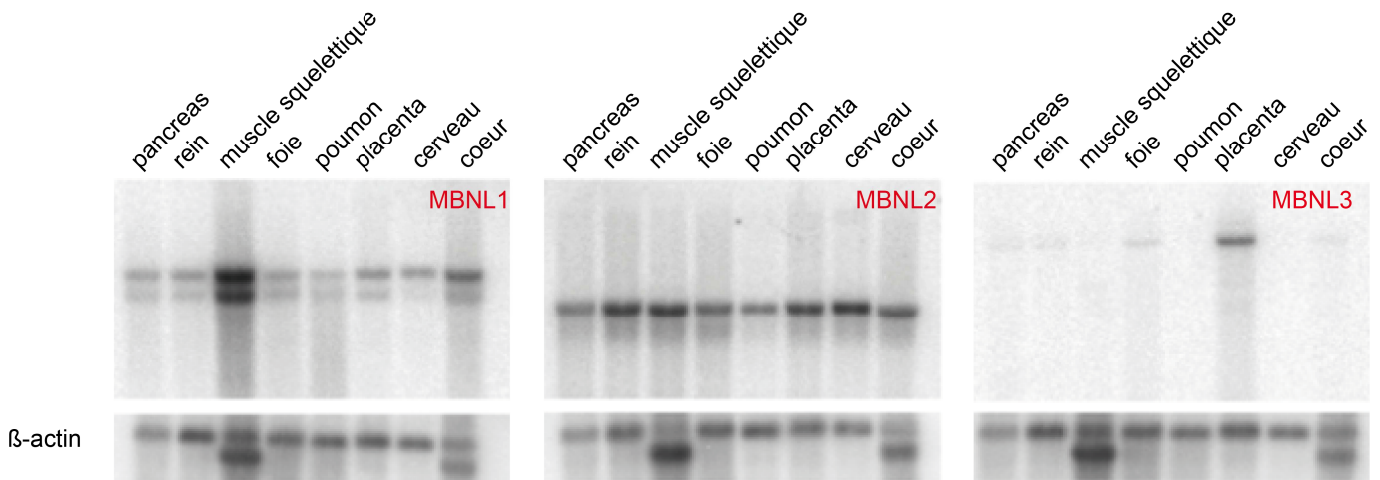


Figure 12. Profils d'expression de MBNL1, MBNL2 et MBNL3

Northern blots avec $\approx 2\mu\text{g}$ d'ARNm par piste hybridé avec MBNL1, MBNL2 ou MBNL3. Les ARNm ont été extraits de tissus humains. MBNL2 est ubiquitaire. MBNL3 est spécifique du placenta alors que MBNL1 bien qu'exprimé dans tous les tissus est plus spécifique du muscle squelettique et du coeur.

Fardaei *et al.*, 2002

2.3.2. Séquestration du facteur d'épissage MBNL1 dans les *foci*

Le gène humain *MBNL1* (*Muscleblind-like 1*) tient son nom de son orthologue chez la *Drosophile*, *Muscleblind* (*Mbl*), dont la mutation cause des phénotypes dans les yeux et les muscles somatiques (Begemann *et al.*, 1997; Artero *et al.*, 1998). Dans un premier temps, MBNL1 a été identifié *in vitro* comme interagissant avec les répétitions CUG double-brin (Miller *et al.*, 2000). Puis, MBNL1 a été retrouvé séquestré dans les *foci* des noyaux des patients DM1 et DM2, ce qui conduit à sa perte de fonction (Figure 11) (Mankodi *et al.*, 2001; Fardaei *et al.*, 2002). MBNL1 n'est pas le seul facteur de sa famille à être séquestré dans les *foci* puisque ses paralogues MBNL 2 et 3 le sont également (Miller *et al.*, 2000; Fardaei *et al.*, 2002; Mankodi *et al.*, 2003). L'implication de ces derniers dans l'effet *trans*-dominant sur l'épissage n'est pas très connue car très peu étudiée étant donné leurs profils d'expression respectifs.

En effet, dans les tissus humains, MBNL1 est exprimé fortement dans le cœur, les muscles squelettiques et les lymphoblastes ainsi que dans une moindre mesure dans le cerveau, le placenta, les poumons, le foie, les reins et le pancréas (Miller *et al.*, 2000; Fardaei *et al.*, 2002). Chez la souris, il a été montré que *Mbnl1* est exprimé dans le cœur, les muscles squelettiques et les yeux mais pas dans le cerveau (Miller *et al.*, 2000). MBNL2 est un facteur d'épissage ubiquitaire qui s'exprime de manière constante dans les différents tissus alors que MBNL3 est plus spécifique du placenta et est détecté faiblement dans le pancréas, les reins, le foie et le cœur (Figure 12).

MBNL1 est sujet à l'épissage alternatif, mais il a été montré que toutes ses isoformes sont séquestrées dans la DM1, grâce à ses exons E3 et E7 présents dans chacune d'elles (Tran *et al.*, 2011).

La structure de la protéine MBNL1 a été décortiquée et a permis de mettre en évidence que les exons E5 et E6 contiennent les segments qui régulent la rétention nucléaire de MBNL1 (Tran *et al.*, 2011). L'exon E3 code pour une région qui module l'épissage alternatif de *hcTNT* et *hIR* alors que l'exon E6 est nécessaire à la régulation de son propre épissage alternatif. Enfin, l'exon E7 contribue à la dimérisation de MBNL1. MBNL1 reconnaît les motifs YGCY des régions introniques précédant l'exon à exclure (Goers *et al.*, 2010).

MBNL1 joue un rôle essentiel dans la pathogénèse de la maladie : il interagit avec de nombreux facteurs et peut influencer leur présence au niveau des *foci*. En effet, autant dans les lignées cellulaires DM1, MBNL1 est présent à 80% au niveau des *foci*, autant ses interacteurs ne le sont qu'à moins de 10% (Paul *et al.*, 2011). Il a été montré par exemple que hnRNP H seul ne colocalise pas avec les *foci* dans les fibroblastes DM1 à moins que MBNL1 ou MBNL2 ne soient apportés (Paul *et al.*, 2006). Les interacteurs ARN-indépendants de MBNL1 sont hnRNP H, H2, H3, F, A2/B1, K et L ainsi que 3 hélicases d'ARN DDX5, DDX17, DHX9 (Paul *et al.*, 2011). Une étude récente confirme que DDX5 et DDX17 endogènes colocalisent avec les

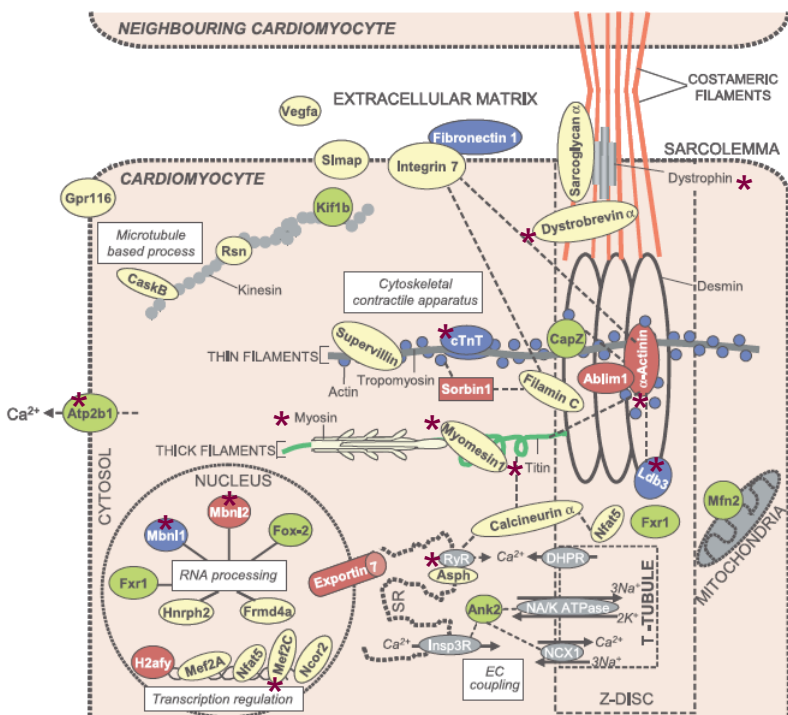


Figure 13. Représentation schématique des gènes subissant une transition post-natale pendant le développement cardiaque

En vert sont représentés les gènes dont l'épissage de transition du transcrit est régulé par CUGBP1. En bleu sont représentés les gènes dont l'épissage de transition du transcrit est régulé par MBNL1. En rouge, les gènes dont les transcrits sont régulés à la fois par CUGBP1 et MBNL1 et enfin en jaune ceux dont la transition est indépendante de CUGBP1 ou MBNL1. L'astérisque violette indique les gènes dont la dérégulation de l'épissage alternatif est connue chez les patients DM1.

d'après Kalsotra et al., 2008

Table 5. Ensemble des gènes connus dont l'épissage alternatif est altéré chez les patients DM1

GENE	Exon dont l'épissage est dérégulé	Référence	GENE	Exon dont l'épissage est dérégulé	Référence
AKAP13	E16	Yamashita et al., 2012	MTMR1	-E2.1 -E2.2	Buj Bello et al., 2002
APP	-E7	Jiang et al., 2004	MXRA7	E4	Yamashita et al., 2012
ATP5G2	E1	Yamashita et al., 2012	MYBPC1	E23	Yamashita et al., 2012
BIN1	-E11	Fugier et al., 2011	MYBPC1	E31	Yamashita et al., 2012
CACNAS	-E19	Tang et al., 2013	MYH14	-E6	Rinaldi et al., 2011
CAPN3	-E16	Lin et al., 2006	MYOM1	+E17A	Koebis et al., 2011
CLCN1	+I2	Charlet et al., 2002	NCOR2	E10	Yamashita et al., 2012
CLCN1	+E6b +E7a	Charlet et al., 2002; Kino et al., 2009	NDUFV3	E3	Yamashita et al., 2012
DMD	-E71	Nakamori et al., 2007	NEB	E116	Yamashita et al., 2012
DMD	-E78	Nakamori et al., 2007	NEDD4L	E13	Yamashita et al., 2012
DTNA	+E11A +E12	Nakamori et al., 2008	NEDD4L	E14	Yamashita et al., 2012
FGD6	E2	Yamashita et al., 2012	NEXN	E2	Yamashita et al., 2012
FHOD1	-E11A	Lin et al., 2006	NFIX	E7	Yamashita et al., 2012
FN1	+E33	Ohsawa et al., 2011	NMDAR1	+E5	Jiang et al., 2004
GFAT1	-E10	Lin et al., 2006	NR4A1	E4	Yamashita et al., 2012
ILF3	E18	Yamashita et al., 2012	PDLIM3	+E5A -E5B	Lin et al., 2006; Mankodi et al., 2006
INSR	-E11	Savkur et al., 2001	PPHLN1	E7	Yamashita et al., 2012
KCNAB1	+E2C	Mankodi et al., 2005	RYR1	+E70	Kimura et al., 2005
LDB3	E4	Yamashita et al., 2012	SERCA1	-E22	Lin et al., 2006; Kimura et al., 2005
LDB3	E7	Yamashita et al., 2012	SERCA2	+I19+E29	Arimura et al., 2009
LDB3	+E11	Lin et al., 2006	SOS1	E21	Yamashita et al., 2012
MAP4K4	E17	Yamashita et al., 2012	TAU	-E2 -E10	Sergeant et al., 2001; Jiang et al., 2004
MBNL1	E6	Yamashita et al., 2012	TBC1D15	E7	Yamashita et al., 2012
MBNL1	E10	Yamashita et al., 2012	TNNT2	+E5	Philips et al., 1998
MBNL1	+E7	Lin et al., 2006	TNNT3	+FETAL EXON	Vihola et al., 2010
MBNL2	E8	Yamashita et al., 2012	TTN	E45	Yamashita et al., 2012
MBNL2	+E7	Lin et al., 2006	TTN	+Zr4 +Zr5	Lin et al., 2006
MEF2C	-E4 -E5	Bachinski et al., 2010	TTN	-MEX5	Lin et al., 2006
MSI2	E14	Yamashita et al., 2012	UBE2D3	-E11	Yamashita et al., 2012

répétitions CUG dans les cultures cellulaires HeLa transfectées avec 200 ou 960 répétitions CTG (Laurent *et al.*, 2012).

La souris invalidée pour *Mbn1* (*Mbn1*^{ΔE3/ΔE3}) reproduit les caractéristiques phénotypiques du modèle murin de la DM1 (HSA^{LR}) ainsi que des patients (myotonie liée à une diminution de l'expression protéique de *Clcn1* dans le muscle, cataracte, noyaux centralisés, fibres qui fourchent et un défaut d'épissage de *Tnnt2* et *Tnnt3*) ce qui démontre le rôle important de la titration de MBNL1 par les répétitions (Kanadia *et al.*, 2003). D'ailleurs, 80% des défauts d'épissage observés dans un modèle de souris DM1 ont été reproduits dans les souris ne possédant pas de protéine *Mbn1* fonctionnelle (Du *et al.*, 2010). Par opposition, la surexpression de MBNL1 dans les souris DM1 (HSA^{LR}) réduit considérablement la myotonie et les défauts d'épissage (Kanadia *et al.*, 2006). Enfin, la dégénération des muscles et de l'œil de la *Drosophile* est atténuée par la surexpression de MBNL1 humain (de Haro *et al.*, 2006).

Les différentes souris *Mbn2*^{-/-} (*Mbn2*^{GT4/GT4}, *Mbn2*^{GT2/GT2}, *Mbn2*^{ΔE2/ΔE2}) ne présentent pas d'effet significatif sur l'épissage de *Clcn1*, *Zasp*, *Serca1*, *Tnnt3*, *Tnnt2*, *Sorbs1* et *M-titin* (Lin *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2008; Charizanis *et al.*, 2012) suggérant que *Mbn1* et *Mbn2* fonctionnent de manière interchangeable pour une gamme large de cibles d'épissage dans le modèle murin (Wang *et al.*, 2012).

2.3.3. Conséquences sur l'épissage

Précédemment nous avons vu que CUGBP1 et MBNL1 sont capables à eux seuls de reproduire bon nombre de caractéristiques de la DM1. MBNL1 et CUGBP1 ont un rôle antagoniste dans leur fonction d'épissage (Kino *et al.*, 2009) et sont impliqués dans la reprogrammation des événements d'épissage qui ont lieu dans le muscle en développement lors de la transition fœtale à post-natale (Lin *et al.*, 2006). Au cours de la vie fœtale, MBNL1 est en faible quantité relativement à CUGBP1 qui est fortement exprimé. A la naissance, il a été montré dans des cœurs de souris que cette tendance s'inverse dans le temps et que par conséquent, le rapport MBNL1/CUGBP1 est inversé (Kalsotra *et al.*, 2008). Cette inversion du rapport des facteurs MBNL1 et CUGBP1 s'accompagne donc d'une reprogrammation de l'épissage alternatif (Figure 13) (Kalsotra *et al.*, 2008). La séquestration de MBNL1 dans les tissus musculaires DM1 adultes accompagnée de l'augmentation de CUGBP1 déséquilibre le rapport entre ces deux facteurs chez le patient DM1 adulte entraînant la réexpression de transcrits musculaires, cardiaques et nerveux sous des isoformes fœtales/embryonnaires non adaptées à la vie *ex utero*. Plusieurs de ces dérégulations de l'épissage alternatif peuvent expliquer les symptômes cliniques des patients.

Que cela passe par une augmentation d'inclusion ou d'exclusion de l'exon régulé par MBNL1 et/ou CUGBP1, l'ensemble des événements d'épissage alternatif connus comme dérégulés à ce jour sont résumés dans la Table 5. Je détaillerai certains d'entre eux dans la suite de cette partie.

Ici, il est intéressant de mentionner que la première cible du facteur MBNL1 est lui-même. Dans la DM1, l'exon E7 du transcrit MBNL1 est retenu, ce qui favorise sa localisation nucléaire plutôt que cytoplasmique (Lin *et al.*, 2006). On peut alors aisément imaginer que de ce fait, davantage de protéines peuvent ainsi être séquestrées dans les *foci*.

- *Les composants des sarcomères et de la structure musculaire*

De nombreux gènes codant pour des composants sarcomériques ou de la structure musculaire présentent un défaut d'épissage de leur transcrit dans la DM1.

C'est le cas pour la *troponine T cardiaque* (*cTNT* ou *TNNT2*), dont l'exon alternatif E5 est anormalement inclus dans les muscles striés et cardiaques des patients DM1 (Philips *et al.*, 1998) résultant en l'expression d'une isoforme fœtale chez l'adulte. Dans le cœur, cette dérégulation peut être à l'origine des troubles de la conduction cardiaque observée chez les patients. L'épissage alternatif de *TNNT2* est probablement régulé par CUGBP1 car capable de lier l'ARN pré-messager humain (Philips *et al.*, 1998). Par ailleurs les souris gain-de-fonction *CUGBP1* présentent également une inclusion accrue de E5 dans leur transcrit *Tnnt2* (Ho *et al.*, 2005a). Cependant, MBNL1 semble également impliqué dans cette dérégulation. En effet, MBNL1 est capable de lier le transcrit *TNNT2* sur un site différent de celui de CUGBP1 et de promouvoir l'exclusion de E5 (Ho *et al.*, 2005b). D'ailleurs, la souris invalidée pour *Mbnl1* exprime l'isoforme fœtale de *Tnnt2* (Kanadia *et al.*, 2003).

L'épissage de plusieurs ARN pré-messagers des protéines associées aux disques Z est aberrant. Il a été montré que l'exon E11 de *ZASP* est exclu ainsi que l'exon Mex5 de *m-Titin* par un mécanisme contrôlé par MBNL1 (Lin *et al.*, 2006). De plus, l'exon E45 de *m-Titin* ainsi que l'exon fœtal E4 de *PDLIM3/ALP*, interacteur de l' α -actinine 2, sont retenus dans la pathologie, mais aucun acteur majeur des familles MBNL et CELF n'a pu être identifié (Ohsawa *et al.*, 2011).

Une puce exonique réalisée à partir de tissus de patients DM1 a permis de révéler la rétention aberrante de l'exon E17a du transcrit de la *myomesin 1*, un constituant de la bande M des sarcomères. Il semblerait que ce soit la séquestration de MBNL1 qui soit responsable de cet épissage aberrant bien que *in vitro* les protéines CELF semblent également participer à l'épissage (Koebis *et al.*, 2011). Par ailleurs, une autre étude montre que MBNL1 régule l'inclusion de l'exon E6 de l'ARNm *MYH14* qui est anormalement exclu dans les muscles squelettiques des patients DM1 (Koebis *et al.*, 2011).

La dérégulation de l'épissage alternatif dans la DM1 touche également des transcrits codants pour les protéines du complexe DGC (Dystrophin-associated Glycoprotein Complex). Il a été montré que dans le muscle squelettique des patients, les exons E71 et E78 du gène *DMD* codant pour la Dystrophine (Dys) sont exclus et que seul E78 est exclu dans le cœur (Nakamori *et al.*, 2007). L'implication de MBNL1 ou CUGBP1 dans cette altération de l'épissage n'a pas été vérifiée. De plus, les tissus cardiaques et musculaires présentent une inclusion anormale

des exons E11a et E12 de l' α -dystrobrevin (Nakamori *et al.*, 2008), favorisant sa liaison avec la syntrophin et modifiant très probablement ainsi la signalisation du complexe DGC dans les muscles DM1.

Enfin, récemment, une puce exonique a permis d'identifier une altération de l'épissage du transcrit *BIN1* (*Bridging integrator-1*) qui code pour la protéine membranaire Amphiphysine II (Fugier *et al.*, 2011). L'exon E11, exclu de manière aberrante et dépendante de MBNL1 chez les patients DM1, code pour un domaine essentiel dans la biogénèse des tubules T, structure membranaire fondamentale pour le couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique. Ainsi, l'expression altérée de la protéine dans la pathologie ne permet plus de jouer son rôle de corset autour des tubules musculaires entraînant une faiblesse musculaire chez la souris (Fugier *et al.*, 2011).

- *Le récepteur à l'insuline*

Les patients DM1 développent parmi d'autres symptômes une résistance à l'insuline différente d'un diabète de type 2 classique (Stuart *et al.*, 1983). Une diminution de l'inclusion de l'exon E11 de l'ARN pré-messager codant le récepteur de l'insuline (IR) a été mise en cause chez les patients (Savkur *et al.*, 2001), résultant en l'expression préférentielle de l'isoforme non musculaire *IR-A* avec une activité plus faible (Kellerer *et al.*, 1992) relativement à l'isoforme *IR-B* normalement exprimée au niveau des tissus responsables de l'homéostasie du glucose (foie, tissus adipeux et muscles squelettiques). Le mécanisme de régulation de l'exclusion de E11 dans la DM1 a été amplement étudié. Il a été montré sur des fibroblastes en culture que la diminution de MBNL1 ou MBNL2 ainsi que l'augmentation de CUGBP1 ou hnRNP H augmentent l'exclusion de E11 (Savkur *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 2006). De plus, MBNL1, CUGBP1 et hnRNP H sont capables de lier directement l'ARN humain de IR *in vitro* (Paul *et al.*, 2006). Plus précisément, il a été décrit que l'épissage de E11 de IR était régulé par la séquence protéique codée par l'exon E3 de MBNL1 (Tran *et al.*, 2011) et que l'absence de fixation de MBNL1 sur le transcrit empêche la liaison de U2AF65, facteur de la machinerie d'épissage, sur l'intron en amont de E11 favorisant leur co-exclusion (Echeverria and Cooper, 2013).

- *Les canaux et pompes*

Plusieurs études ont montré que l'épissage de transcrits de transporteurs passifs ou actifs du calcium, du chlore et du potassium était altéré dans la DM1.

Doit être cité en premier lieu le transcrit codant le canal chlore muscle-spécifique (*CIC-1*). Dans la DM1, la majorité des ARNm *CIC-1* de patients DM1 gardent insérés les exons E6b et E7a ayant pour conséquence la rétention d'un codon stop prématuré dans la protéine (Charlet *et al.*, 2002; Mankodi *et al.*, 2002; Lueck *et al.*, 2007a; Lueck *et al.*, 2007b). Il a été montré *in vitro* que ce sont les facteurs MBNLs qui sont normalement impliqués dans l'exclusion de ces exons (Kino *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'intron 2 est anormalement retenu dans le transcrit *CIC-1* de manière dépendante de CUGBP1 (Charlet *et al.*, 2002). La rétention de E7a

est conservée dans les souris HSA^{LR} (DM1) et invalidées pour Mbn11 (Mankodi *et al.*, 2002; Kanadia *et al.*, 2003). Ces deux modèles ont permis de montrer dans un premier temps que la myotonie était liée à l'absence des canaux CIC-1 dans les muscles (Wheeler *et al.*, 2007). Cependant, une étude plus récente sur ces mêmes souris HSA^{LR} montre que cette observation est vraie chez les jeunes souris mais qu'en vieillissant, l'hyperexcitabilité serait due à l'altération d'autres conductances (Difranco *et al.*, 2012).

Parmi les autres conductances qui peuvent être mises en jeu dans la myotonie il y aurait potentiellement celle du calcium. En effet, trois de ses transporteurs sont mal épissés dans la DM1. C'est le cas de la pompe calcique SERCA (Sarco/Endoplasmic reticulum Calcium-ATPase) dont les paralogues 1 et 2 sont tous deux mal épissés. Cette pompe est impliquée dans la recapture du calcium après la contraction musculaire afin de permettre la relaxation. Il a été mis en évidence dans les tissus sains que MBNL1 régule l'excision de l'exon E22 de *SERCA1* qui code pour le domaine terminal de la protéine. Cela se traduit dans les muscles des patients DM1 par l'augmentation de l'isoforme néonatale *SERCA1B* aux dépens de l'isoforme adulte *SERCA1A* (Kimura *et al.*, 2005). Dans le cas du transcrite *SERCA2*, il se produit une rétention de l'intron I19 chez les patients DM1 (Kimura *et al.*, 2005). Il existe également des anomalies d'épissage du transcrite du récepteur à la Ryanodine *RYR1* (Kimura *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2009) dont le rôle est de libérer le calcium pour permettre la contraction musculaire. Plus précisément, il s'agit de l'exclusion de l'exon E70 dans le transcrite *RYR* qui entraîne l'expression de l'isoforme embryonnaire de l'ARN (Kimura *et al.*, 2005). Les conséquences de ces dérégulations n'ont pas été investiguées. Cependant, il a été suggéré qu'elles interviendraient dans l'atrophie/faiblesse musculaire ou dans des anomalies de conduction cardiaques. Récemment il a été montré sur des tissus de patients DM1 et DM2 que l'exon E29 du gène *CACNA1S* codant la sous-unité principale du récepteur aux dihydropyridines DHPR était anormalement exclu. Ce canal voltage-dépendant permettant l'entrée des ions calciques sous l'influence du potentiel d'action provenant des motoneurones, permet l'activation de RyR1. Une étude a montré que le niveau d'exclusion de l'exon E29 du gène *CACNA1S* chez les patients était positivement corrélé à la faiblesse musculaire de leur tibia antérieur (Tang *et al.*, 2012).

Enfin, le gène *KCNAB1* code pour la sous-unité β ($Kv\beta$) qui lie et régule la sous-unité α formant le pore des canaux potassiques voltage dépendants. Dans le cœur, il s'est avéré que les patients DM1 présentent une expression accrue de l'isoforme $Kv\beta 1.3$ relativement à l'isoforme $Kv\beta 1.2$, indiquant un défaut d'épissage de l'exon 2 (Mankodi *et al.*, 2005). Les conséquences d'un tel défaut sur la physiopathologie cardiaque n'ont pas été recherchées à ce jour.

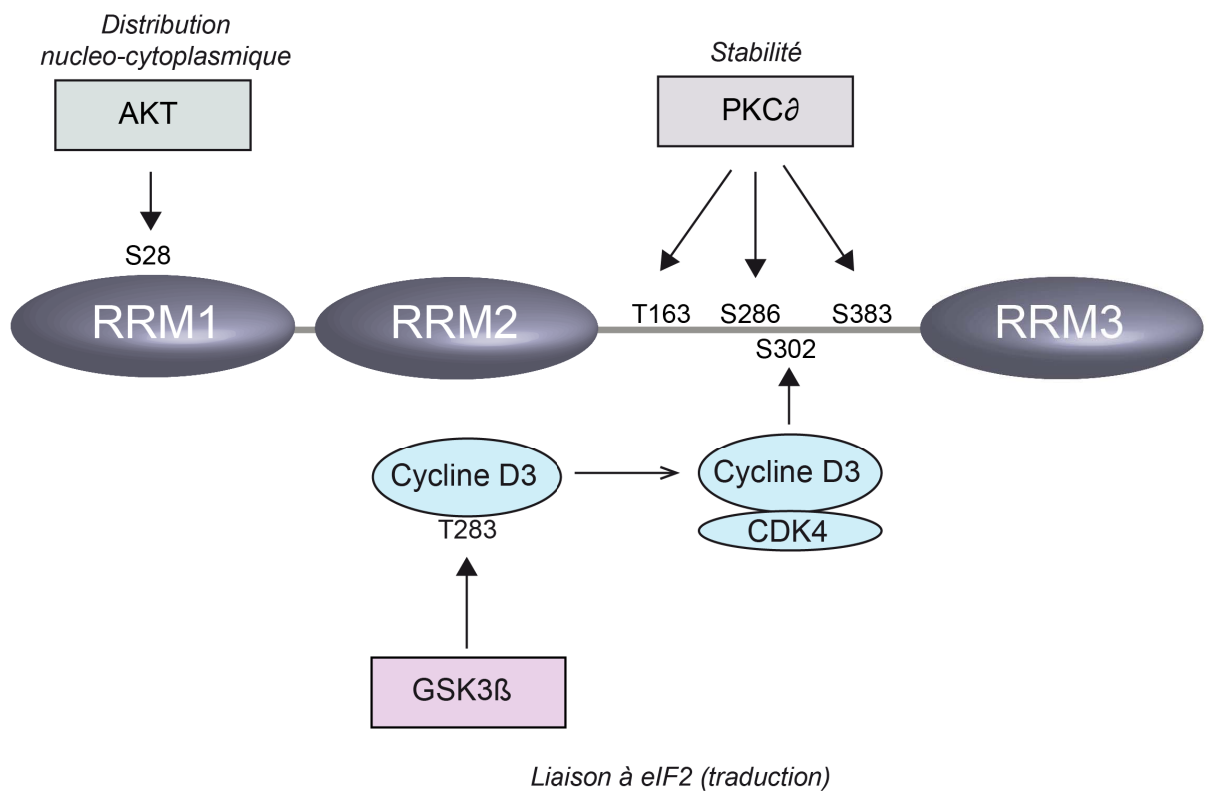


Figure 14. Les fonctions biologiques de CUGBP1 contrôlées par phosphorylation différentielle

CUGBP1 possède des sites de phosphorylation aux kinases AKT, CDK4 et PKC δ qui régulent respectivement sa distribution cellulaire, son rôle dans la traduction et sa stabilité. L'activité de ces kinases (AKT, PKC, GSK3 β) est elle-même contrôlée par phosphorylation/déphosphorylation altérée dans la DM1 par un mécanisme encore inconnu.

2.4. Altération de la stabilité des transcrits et de la traduction

Comme je l'ai évoqué ultérieurement, CUGBP1 est une protéine multi-fonctionnelle capable de se fixer à l'ARN pour réguler son métabolisme à différents niveaux incluant la traduction coiffe-dépendante et indépendante, l'épissage alternatif et la stabilité (Ladd *et al.*, 2001; Salisbury *et al.*, 2008). Il a été suggéré que l'activité de CUGBP1 est régulée selon une phosphorylation différentielle (Figure 14). En effet, CUGBP1 possède plusieurs sites de phosphorylation. Par exemple, la phosphorylation de CUGBP1 par AKT sur sa Ser28 contrôle sa localisation nucleo-cytoplasmique et donc son activité (Huichalaf *et al.*, 2010).

De même, la phosphorylation de CUGBP1 sur sa Ser302 par la cycline D3/CDK4 permet son association avec le facteur d'initiation de la traduction eIF2 permettant à CUGBP1 de réguler la traduction (Timchenko *et al.*, 2006) de *p21* (Iakova *et al.*, 2004), *C/EBP β* (Karagiannides *et al.*, 2006) et *Mef2A* (Timchenko *et al.*, 2005) dans les cellules musculaires en différenciation. Dans les cellules DM1, la quantité de cycline D3 est diminuée (Salisbury *et al.*, 2008) par phosphorylation de sa Thr283 par GSK3 β activée en condition pathologique (Jones *et al.*, 2012) (Figure 14). Ainsi, l'absence d'expression de la protéine *p21* dans les myoblastes de patients a été corrélée avec l'absence d'arrêt du cycle cellulaire, étape nécessaire pour la différenciation myogénique (Timchenko *et al.*, 2001b).

Concernant le rôle de CUGBP1 dans la régulation de la stabilité des transcrits, il a été montré que les éléments GU-riches (GRE) et AU-riches (ARE) sont enrichis dans les régions 3' non traduites de transcrits à courtes durées de vie reconnus par CUGBP1 (Moraes *et al.*, 2006; Vlasova *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010; Rattenbacher *et al.*, 2010). Parmi ceux-ci, sont principalement retrouvés des transcrits impliqués dans le cycle cellulaire, le transport, *myod1*, *Myog* (Lee *et al.*, 2010) ainsi que *c-fos* et *TNF α* (Moraes *et al.*, 2006). Dans la mesure où la dégradation des ARNs est bien souvent précédée par un raccourcissement de leur queue poly(A), il reste à déterminer si la dégradation des transcrits médiée par CUGBP1 est une conséquence de son activité de déadénylation. En effet, CUGBP1 interagit également avec la déadénylase PARN (poly(A)-specific ribonuclease), suggérant que CUGBP1 facilite la déadénylation soit en recrutant, soit en stabilisant la déadénylase sur ses substrats (Moraes *et al.*, 2006). La stabilisation de *TNF α* par expression de répétitions CUG non codantes ou activation de la PKC dans les myoblastes pourrait être à l'origine de la fonte musculaire observée chez les patients (Zhang *et al.*, 2008) ou des complications arythmiques du cœur (Mammarella *et al.*, 2002). Une étude récente a montré que la liaison de CUGBP1 à ses cibles telles que *TNF α* se fait par les trois domaines de liaison à l'ARN (RRM), chacun capable de fixer un motif UGU suffisamment espacé du suivant pour pallier l'encombrement stérique (Edwards *et al.*, 2013). Il est supposé que le motif AU-riche retrouvé sur les cibles et contenant les motifs UGU faciliterait la formation d'une structure secondaire de l'ARNm permettant de présenter plus favorablement les motifs UGU à la protéine CUGBP1 (Edwards *et al.*, 2013).

Jusqu'à présent, il était accepté que MBNL1 régule uniquement l'épissage alternatif. Une étude récente a montré que non seulement MBNL1 se lie de préférence aux répétitions CTG dans la région 3' non traduite des ARNm mais qu'en plus, sa liaison promeut leur dégradation (Masuda *et al.*, 2012). Parmi les cibles identifiées de MBNL1 (et CUGBP1 également) on peut mentionner *Pitx2* et *Myod1* tous deux impliqués dans la myogénèse ainsi que *Mbnl2*, *Mbnl1* et *Cugbp1* (Masuda *et al.*, 2012).

2.5. Rôles des ARNs non codants dans la DM1

Il est communément admis que MBNL1 et CUGBP1 jouent tous deux un rôle clé dans la pathogénèse de la DM1 en régulant l'expression post-transcriptionnelle d'un grand nombre de transcrits codants. Cependant du fait de la structure secondaire formée par les répétitions CUG non codantes et de la transcription d'un transcrit anti-sens des répétitions, les recherches s'orientent depuis ces toutes dernières années vers les ARNs non-codants et leurs rôles dans la maladie.

2.5.1. Implication des miARNs dans la DM1

L'une des hypothèses exploitées dernièrement est que certains microARNs (miARNs) impliqués dans le développement musculaire et neuronal pourraient être dérégulés dans la pathologie expliquant une partie des symptômes observés. En effet, les dérégulations de 185 myomiRs, des miARNs enrichis dans les tissus des muscles cardiaque et squelettiques, ont été identifiées dans dix maladies musculaires humaines (Eisenberg *et al.*, 2007) démontrant l'importance des miARNs dans la fonction musculaire.

Dans un premier temps, il a été montré que dans les tissus du muscle squelettique provenant de biopsies de patients DM1 relativement à des tissus musculaires sains, l'expression de *miR-206*, *miR-1* et *miR-335* est accrue dans les muscles des patients DM1 notamment dans les noyaux centralisés (Gambardella *et al.*, 2010). Au contraire, les microARNs *miR29b*, *miR-29c* et *miR-33* sont moins exprimés et l'expression des cibles de *miR-1* et *miR-29* est affectée (Perbellini *et al.*, 2011). Les conséquences potentielles de telles dérégulations sont présentées dans la figure 15. Le mécanisme mis en jeu pour expliquer ces dérégulations n'a pas encore été identifié.

Ces résultats obtenus pour *miR-1* sont contradictoires avec ceux obtenus à partir d'échantillons de cœur de patient DM1 où il a été montré que la quantité de *miR-1* est diminuée (Rau *et al.*, 2011). Disséquer le processing de *miR-1* a permis de montrer que dans les cellules cardiaques saines, MBNL1 lie le *pré-miR-1* de manière compétitive avec LIN28. Cette liaison permet la maturation du *pre-miR-1* en *miR-1* et par conséquent la régulation de ses cibles GJA1 (connexine 43) et CACNA1C (canal calcique de type L) impliquées dans le rythme et la conduction cardiaque. En revanche, dans les cellules DM1, la séquestration de MBNL1 par les répétitions favorise la liaison de LIN28 au *pré-miR-1* permettant ainsi son uridylation. Ainsi

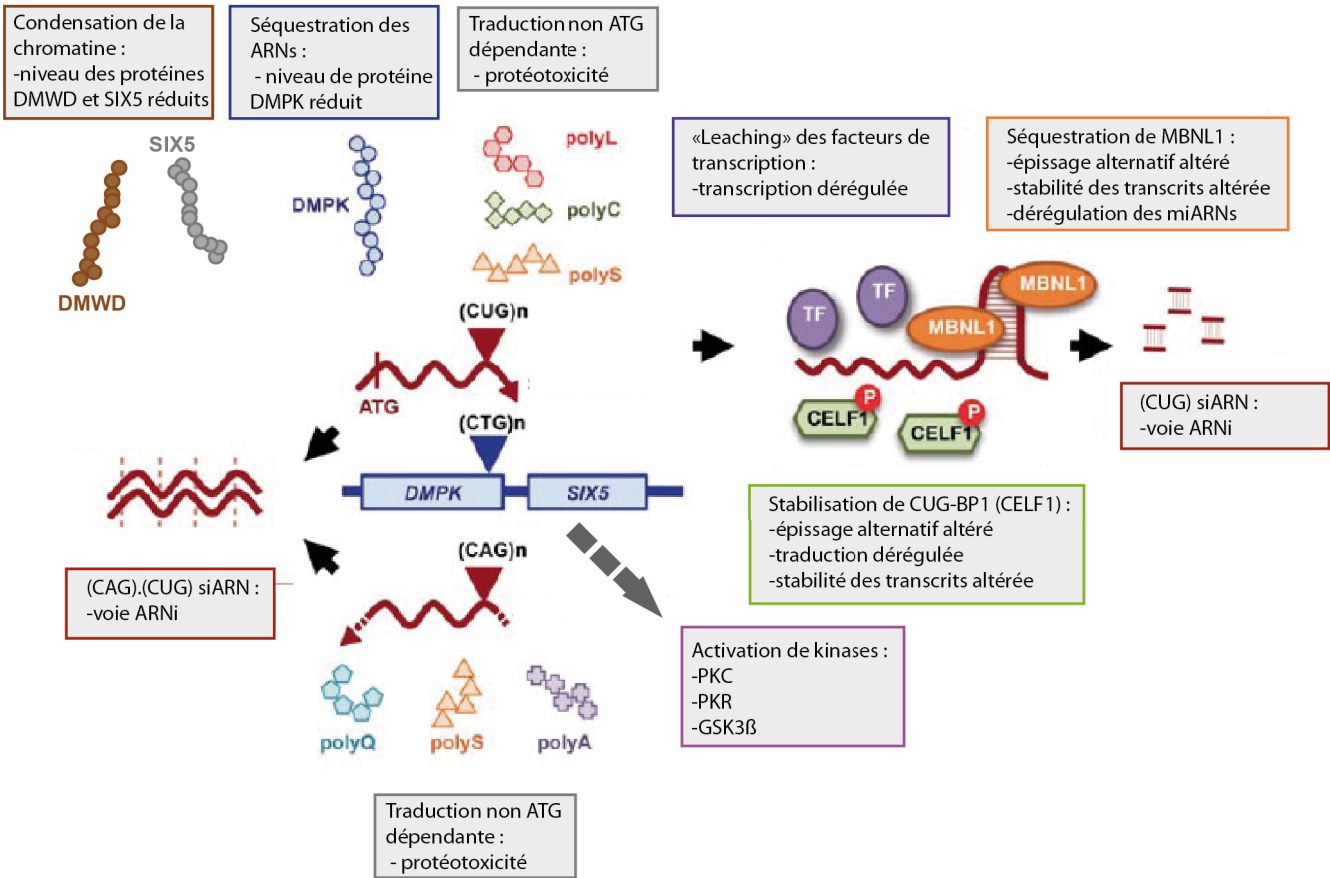


Figure 17. Schéma bilan de la pathogénèse de la DM1

Le gène muté *DMPK* est transcrit de manière bi-directionnelle et donne naissance à un transcrit sens et un transcrit anti-sens. Le transcrit muté *DMPK* contenant les répétitions CUG forme une structure secondaire et s'agrège dans les noyaux des cellules DM1, diminuant le niveau de protéines *DMPK*. La condensation de la chromatine au locus *DMPK* diminue les niveaux de protéines des gènes adjacents à *DMPK*, *DMWD* et *SIX5*. La perte de fonction de MBNL1 médiée par sa séquestration dans les *foci* ribonucléiques, dérégule l'épissage alternatif mais aussi le métabolisme de miARNs et la stabilité des transcrits. L'hyper-phosphorylation de CUGBP1 (CELF1) et sa stabilisation affectent l'épissage alternatif, la stabilité et l'efficacité de traduction des transcrits. Le « leaching » des facteurs de transcription (TF) par les transcrits *DMPK* mutés peut altérer l'expression de leurs gènes cibles. Les voies de l'interférence des ARNs peuvent être activées par la génération de siARNs à partir de la structure contenant les répétitions CUG ou de l'hybridation des transcrits *DMPK* sens et anti-sens. Les transcrits *DMPK* sens et anti-sens peuvent être traduits indépendamment du site d'initiation de la traduction et générer tous les homopolymères des six cadres de lecture possibles ce qui peut être néfaste pour la cellule.

modifié, le *pré-miR-1* ne peut plus être pris en charge par Dicer et donc mûri. Par conséquent, *miR-1* est en quantité moins importante dans les cellules DM1 et ses cibles GJA1 et CACNA1C sont elles en quantité plus importante, favorisant respectivement un défaut de conduction et une arythmie cardiaque (Figure 16) (Rau *et al.*, 2011).

Récemment, une étude menée sur un modèle de *Drosophile* de la DM1 montre que la quantité de dix-neuf miARNs était diminuée par l'expression des répétitions CUG dans les muscles somatiques (Fernandez-Costa *et al.*, 2012). Parmi ces dix-neuf miARNs, trois ont été validés sur des biopsies de muscles squelettiques de patients, *miR-1*, *miR-7* et *miR-10a*, confirmant les résultats obtenus dans le cœur par l'équipe de Nicolas Charlet-Berguerand. Par ailleurs, cette étude montre que Mbl, l'orthologue de MBNL1, est bien impliqué dans la diminution de *miR-1*, mais que pour *miR-7*, c'est une diminution du *pré-miR-7* qui est en cause et par conséquent un autre mécanisme (Fernandez-Costa *et al.*, 2012).

2.5.2. Implication des siARNs dans la DM1

Deux mécanismes liés à la structure du transcrit *DMPK* muté et au locus du gène peuvent générer des siARN dans la DM1.

Ultérieurement, j'ai mentionné que l'expression d'un transcrit anti-sens aux répétitions CTG permettait de générer des siARNs (Cho *et al.*, 2005). Un nouveau modèle de *Drosophile* de la DM1 a permis de montrer que la co-expression des répétitions CTG non codantes avec des transcrits contenant des répétitions longues de CAG non codantes aggravait les phénotypes de la DM1 en diminuant l'expression de gènes contenant des répétitions CAG tels que *ataxine-2 (atx-2)* ou *TATA binding protein (TBP)*. Le mécanisme mis en jeu dépend de l'activité de Dcr2 et Ago2, impliqués dans la biogénèse des siARNs (Yu *et al.*, 2011).

Par ailleurs, il a été suggéré, que les transcrits contenant de longues structures de type tige-boucle imparfaite, composées de répétitions CNG (où N représente n'importe quel nucléotide), sont des cibles de Dicer. Le découpage de cet ARN double-brin induit la production de petits fragments CUG issus de la digestion par Dicer qui pourraient agir comme siARN et être utilisés par la voie de l'interférence à ARN pour éteindre l'expression génique de transcrits contenant des séquences complémentaires, contribuant ainsi aux altérations d'expression de plusieurs gènes dans la pathologie (Krol *et al.*, 2007). Cependant, cela n'a pas encore été confirmé *in vivo* dans la DM1.

En conclusion de ce chapitre, je tiens à souligner l'extrême complexité de la pathogénèse de la DM1 résumée dans la Figure 17. L'expression d'une expansion de répétitions CUG non codantes perturbe de manière directe et indirecte de nombreux mécanismes cellulaires différents et ceci de façon dissemblable d'un tissu à l'autre.

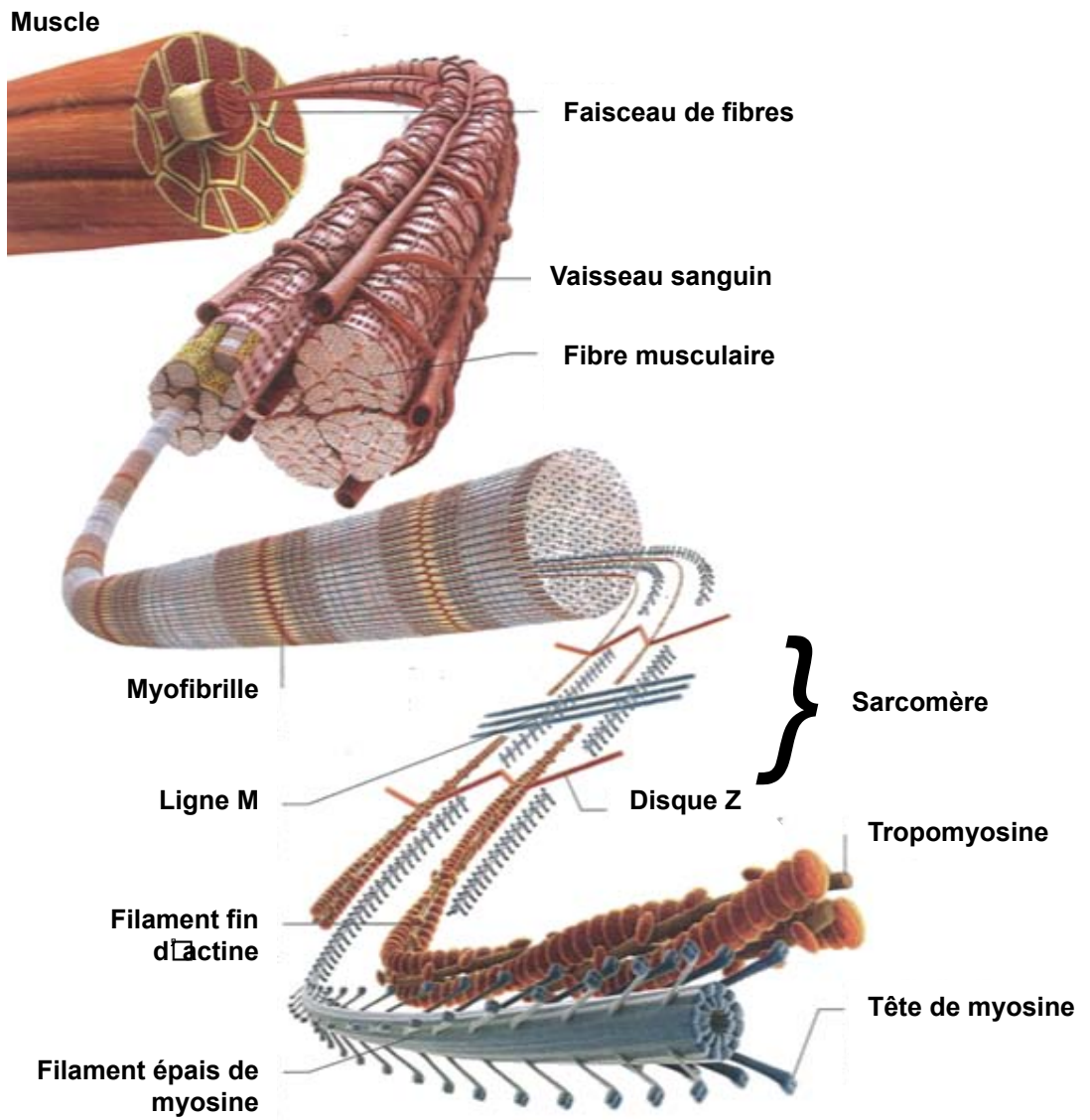


Figure 18. Schéma d'organisation du muscle squelettique

<http://bcube.co.in/blog/training-variables-consider-while-designing-successfulshortlong-term-training-program-part-i>

Table 6. Caractéristiques des différents types de fibres musculaires

Type	Contraction	Métabolisme	Résistance à la fatigue
I	lente	oxidatif	forte
II	rapide	oxido-glycolytique	forte
		glycolytique	faible

III. Le muscle squelettique

La myogenèse est le processus qui permet de générer l'ensemble de la musculature d'un organisme. Quel que soit l'organisme, le tissu musculaire (cardiaque, squelettique ou lisse) provient du mésoderme embryonnaire. La conservation de la mise en place de ces tissus et de leur composition permet des études histologiques comparatives entre patients et modèles animaux dans le cas d'histopathologies telles que la DM1. Dans ce chapitre, je décrirai dans un premier temps les anomalies histologiques observées sur les muscles squelettiques des patients DM1. Puis, je développerai la mise en place des muscles squelettiques chez les vertébrés par comparaison avec celle de la *Drosophile* en insistant sur les étapes dérégulées au cours de la myogenèse dans la DM1 et en particulier l'acquisition de la fonction musculaire.

1. Histopathologie des muscles des patients DM1

1.1. Anatomie du muscle sain

Le muscle squelettique est constitué de faisceaux musculaires formés eux-mêmes d'un ensemble de fibres musculaires juxtaposées et parallèles (Figure 18). Chaque fibre est formée de la fusion de plusieurs centaines de cellules appelées myoblastes. Les noyaux des fibres musculaires sont accolés à la membrane plasmique (sarcolemme), ne nuisant pas aux éléments contractiles. Chaque fibre musculaire est formée de myofibrilles, elles-mêmes constituées de l'unité contractile du muscle, le sarcomère.

Plusieurs couches de tissus conjonctifs séparent et protègent les composantes des muscles squelettiques. L'endomysium sépare chaque fibre musculaire, le périmysium organise de 10 à 100 fibres musculaires en faisceaux et l'épimysium est la couche extérieure qui enveloppe tout le muscle.

On distingue enfin 3 types de fibres musculaires (I, IIA et IIB) dont les caractéristiques sont récapitulées dans la table 6.

1.2. Analyses histologiques des tissus musculaires des patients DM1

Comme je l'ai évoqué auparavant, les muscles squelettiques et en particulier les muscles distaux sont affectés par la DM1. La myotonie est le symptôme clé de ce tissu. Cependant, on peut recenser d'autres signatures histologiques permettant de poser un diagnostic.

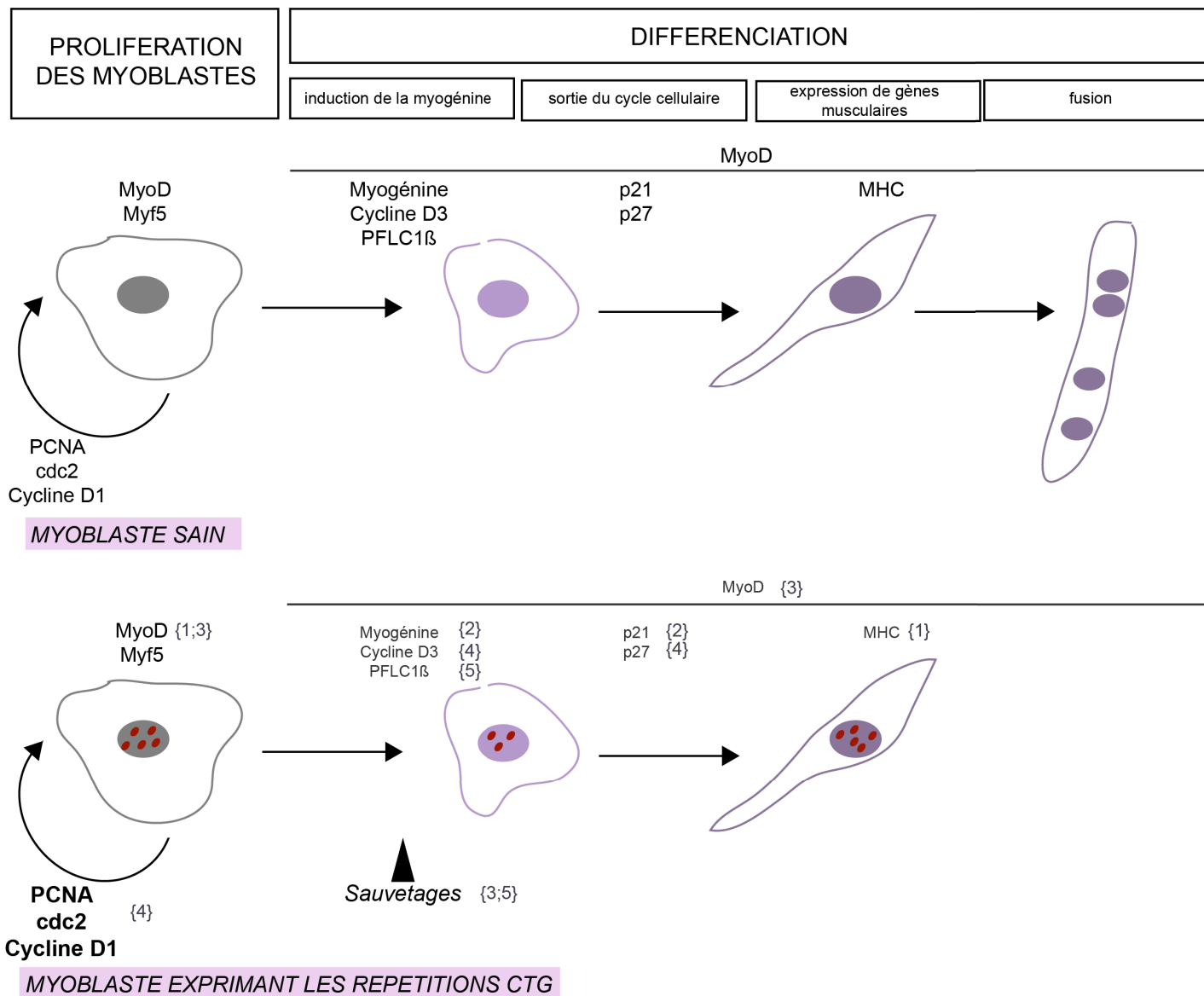


Figure 19. Différenciation altérée des myoblastes exprimant *DMPK* muté

L'expression du transcrit muté *DMPK* empêche l'expression de myogénine, Cycline D3, PFLC1, p21, p27 et MHC permettant la différenciation des myoblastes. Au contraire, l'expression des marqueurs du cycle cellulaire PCNA, cdc2 et Cycline D1 est augmentée. CUGBP1 est un interacteur direct des transcrits de la Cycline D1 et de p21. L'apport de Myogénine ou PFLC1β permet d'obtenir des myotubes en culture donc de restaurer la différenciation. Ainsi les voies en aval de l'étape d'induction de la myogénine ne sont pas désactivées. {1} Furling *et al.*, 2001; {2} Amack and Mahadevan, 2001; {3} Amack and Mahadevan, 2003; {4} Salisbury *et al.*, 2008; {5} Faenza *et al.*, 2012

Certaines caractéristiques des muscles des patients DM1 sont semblables à celles d'autres dystrophies musculaires :

- La division des fibres musculaires observée lors d'autopsies de patients (Maynard *et al.*, 1977; Grimby *et al.*, 1988)
- Taux élevé de noyaux centralisés en particulier dans les fibres atrophiées (Pisani *et al.*, 2008)

Parmi les caractéristiques histologiques spécifiques à la DM1, il y a l'atrophie sélective des fibres de type I (Vihola *et al.*, 2003; Pisani *et al.*, 2008). Par ailleurs, le nombre de cellules satellites est augmenté dans les muscles distaux alors que la régénération du tissu musculaire est très peu observée (Thornell *et al.*, 2009).

1.3. Comportement des myoblastes de patients en culture

En réalité, la capacité proliférative des cellules satellites *in vitro* est fortement diminuée et de manière prématurée (Furling *et al.*, 2001a; Thornell *et al.*, 2009). La sénescence prématurée des cellules satellites musculaires de patients DM1 n'est pas due à un raccourcissement des télomères (Thornell *et al.*, 2009) mais se fait par un mécanisme dépendant de p16 (Bigot *et al.*, 2009).

Il a été montré *in vitro* que la capacité des cellules satellites des patients CDM1 à fusionner pour former des myotubes est diminuée (Furling *et al.*, 2001a). L'expression de la région 3' non traduite du transcrit *DMPK* muté dans les cellules C2C12 diminue également significativement la formation de myotube (Amack and Mahadevan, 2001). Il n'a jamais été démontré que le processus de fusion puisse être affecté par l'expression de répétitions CUG. Les études se sont majoritairement concentrées sur le processus de différenciation des cellules musculaires (Figure 19). En effet, les myoblastes exprimant *DMPK* muté surexpriment les protéines du cycle cellulaire PCNA, *cdc2* et cycline D1 et ont des niveaux réduits d'inhibiteurs du cycle cellulaire p21 et p27 (Amack and Mahadevan, 2001; Salisbury *et al.*, 2008) favorisant la phase de prolifération des myoblastes. Au contraire, les niveaux de myogénine, cycline D3, PFLC1 β et MHC qui sont des acteurs de la différenciation des myoblastes en myotubes sont diminués (Amack and Mahadevan, 2001; Furling *et al.*, 2001b; Salisbury *et al.*, 2008; Faenza *et al.*, 2012). Enfin, si le niveau de MyoD des myoblastes en prolifération est inchangé (Amack and Mahadevan, 2001; Furling *et al.*, 2001b; Amack *et al.*, 2002), celui des myoblastes en différenciation est diminué en contexte DM1 (Amack *et al.*, 2002). Deux études ont montré que l'apport de myogénine ou PFLC1 β dans les myoblastes DM1 permettait de restaurer la formation de myotubes et par conséquent la différenciation (Amack *et al.*, 2002; Faenza *et al.*, 2012). Ainsi les étapes de différenciation en aval de l'expression de la myogénine ne sont pas désactivées. L'observation en microscopie électronique des myoblastes DM1 qui n'entrent pas en différenciation montre la présence de vacuoles autophagiques (Befy *et al.*, 2010).

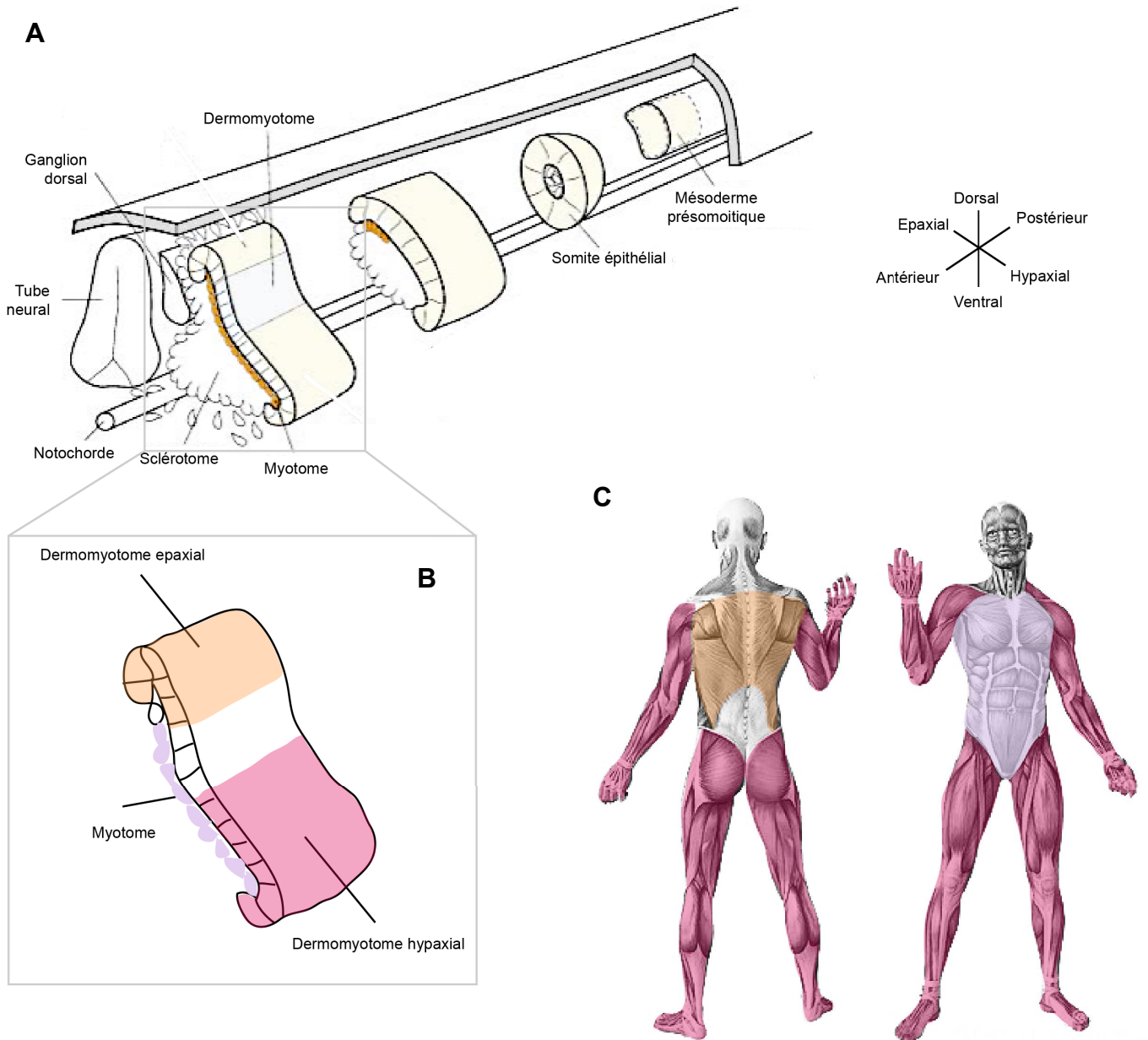


Figure 20. Somitogénèse et subdivision des somites chez le vertébré

A) Le mésoderme présomatique se segmente en somites qui se subdivisent en trois compartiments : le dermomyotome (jaune), le myotome (orange) et le sclérotome (blanc). B) Le dermomyotome est compartimenté selon l'axe medio-lateral en dermomyotome epaxial (orange) et dermomyotome hypaxial (rouge). C) Origine des muscles du corps humain selon le code couleur de la figure B.

2. Myogénèse vertébrée et fonction musculaire

Dans ce sous-chapitre, je donnerai une vue d'ensemble de la mise en place des muscles des membres, qui sont les muscles squelettiques les premiers affectés dans la DM1. Pour ces muscles, la myogénèse peut être divisée en six étapes : (i) la formation du dermomyotome à partir des somites, (ii) la délamination des précurseurs des myoblastes, (iii) la migration dans les bourgeons de membre, (iv) la prolifération, (v) la détermination des myoblastes et enfin (vi) leur différenciation en myocytes mononucléés qui fusionnent entre eux pour former une fibre musculaire multinucléée.

2.1. Somitogénèse et formation du dermomyotome

Le mésoderme paraxial, situé de part et d'autre du tube neural, adopte une structure transitoire, appelée somite, à l'origine des muscles du tronc et des membres. Chaque somite se forme par paire de part et d'autre du tube neural et de façon séquentielle selon l'axe antéro-postérieur (Pourquie, 2003) de manière dépendante d'un gradient de FGF8 comme il a été montré chez le poulet (Dubrulle *et al.*, 2001).

Seuls les somites ont la capacité de former du muscle squelettique, cette compétence étant acquise au cours de leur compartimentation, elle-même contrôlée par les signaux émanant des structures environnantes. Dans un premier temps, il se produit une subdivision selon l'axe dorso-ventral des somites : le sclérotome à l'origine du cartilage et des os est déterminé ventralement par une transition épithélio-mésenchymateuse. Dorsalement, le dermomyotome est à l'origine du derme et des muscles squelettiques (Figure 20A).

Le dermomyotome est ensuite régionalisé selon l'axe medio-latéral, sous l'influence de signaux provenant du mésoderme latéral (Bone Morphogenetic Protein, BMP), de l'ectoderme (Wnt, Wingless type), du tube neural (Wnt et Sonic Hedgehog, Shh) et de la notochorde (Shh). L'action de Wnt (tube neural) et Shh déterminent les muscles épaxiaux, proches du tube neural (Marcelle *et al.*, 1997) qui correspondent aux muscles dorsaux. L'action combinée des signaux BMP et Wnt (ectodermique) spécifie le développement des muscles hypaxiaux, éloignés du tube neural (Dietrich *et al.*, 1998), qui donnent les muscles des membres, de la langue, de la ceinture abdominale et du diaphragme. Les muscles de la tête proviennent du mésoderme antérieur paraxial non segmenté (Figure 20B-C).

2.2. Du précurseur musculaire au myocyte

2.2.1. Délamination et migration

La première masse à se former sous le dermomyotome est le myotome (Figure 20). Les cellules qui le constituent par délamination du dermomyotome ont une origine épaxiale et hypaxiale. Les cellules musculaires progénitrices qui constitueront les muscles des membres

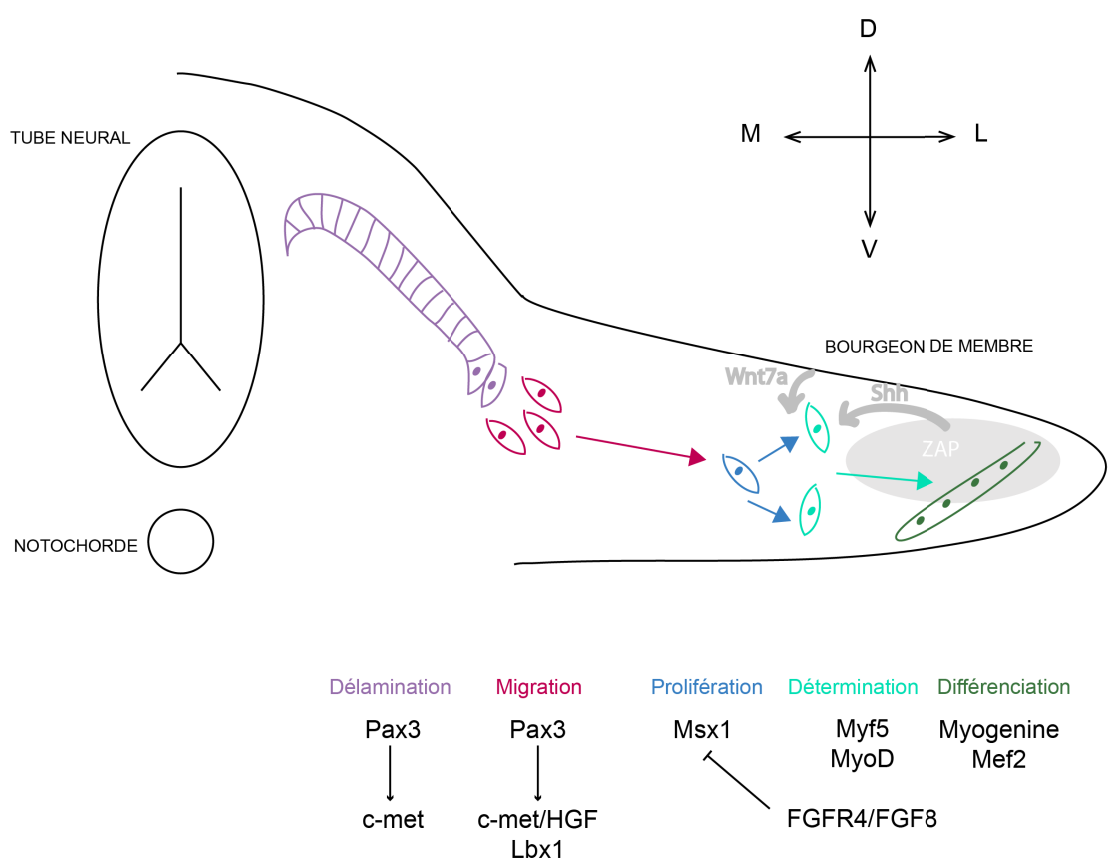


Figure 21. Représentation schématique de la formation du muscle squelettique dans les membres et des gènes impliqués à chaque stade

ZAP: Zone d'activité polarisante

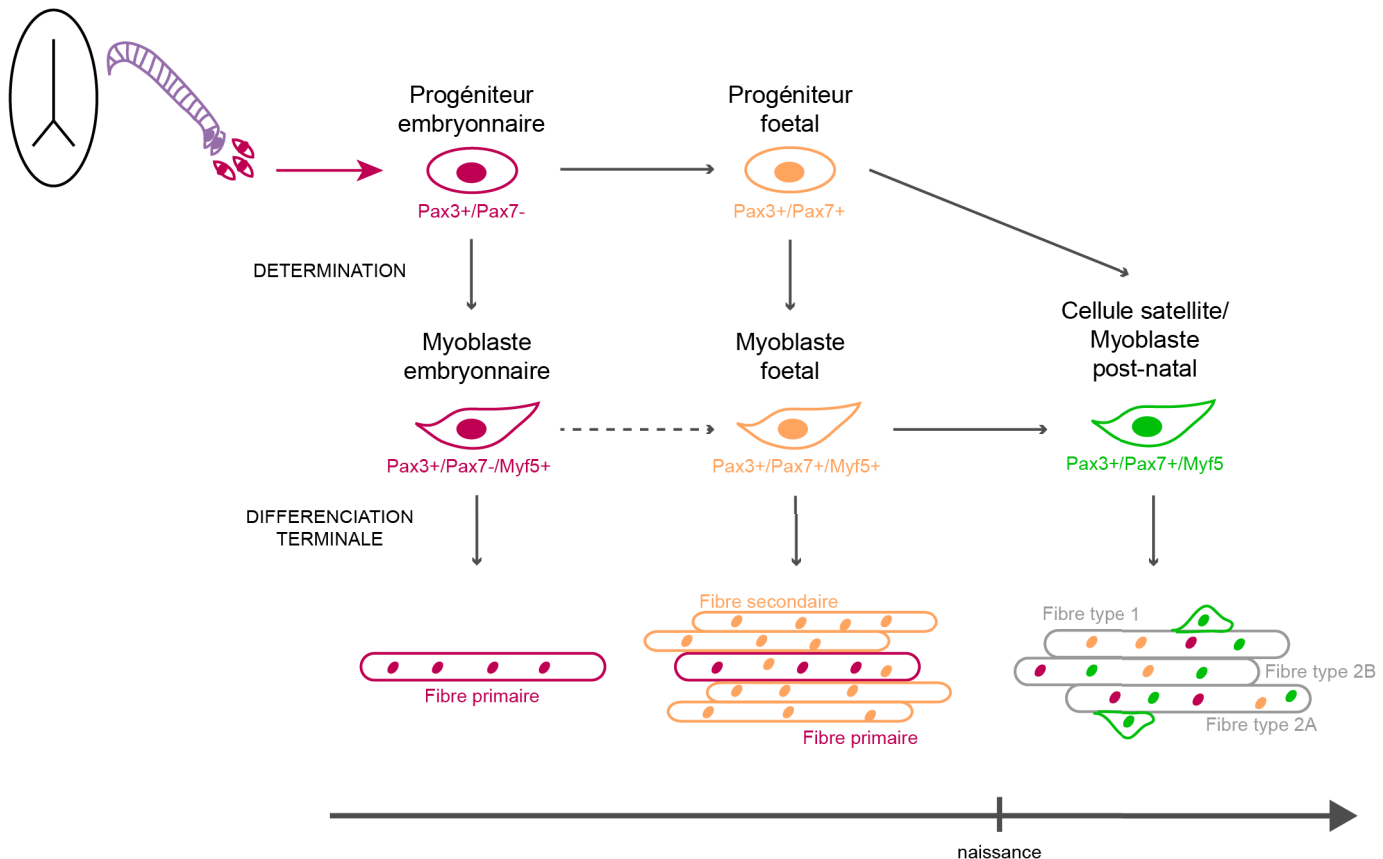


Figure 22. Résumé du modèle des myogénèses embryonnaire, fœtale et adulte du membre de la souris

délaminent des lèvres de la région hypaxiale et migrent pour coloniser les bourgeons de membre (Figure 21). La délamination dépend du récepteur tyrosine kinase c-met dont la transcription est sous le contrôle du facteur de transcription Pax3 (Bladt *et al.*, 1995; Epstein *et al.*, 1996). La migration quant à elle est dépendante du facteur de transcription Lbx1 (Ladybird-like homeobox) dont l'expression est également contrôlée par Pax3 (Bober *et al.*, 1994; Brohmann *et al.*, 2000) ainsi que de c-met et son ligand HGF.

2.2.2. Prolifération puis différenciation

Une fois dans les bourgeons de membres, les cellules prolifèrent sous le contrôle du facteur de transcription à homéodomaine Msx1 (Houzelstein *et al.*, 1999) et donne naissance à deux types cellulaires musculaire ou endothélial (Kardon *et al.*, 2002; Hutcheson *et al.*, 2009). La détermination des myoblastes nécessite la sortie du cycle cellulaire qui requiert FGF8 et FGFR4 son récepteur (Marics *et al.*, 2002). Les myoblastes enfin déterminés expriment les facteurs de transcription myogéniques (MRFs) Mrf4, Myf5 et MyoD potentiellement sous l'influence de Wnt7a et Shh provenant respectivement de la surface de l'ectoderme dorsal et de la zone d'activité polarisante du bourgeon (Biressi *et al.*, 2007). L'activation du programme de différenciation du myoblaste en myocyte dépend de la présence de la Myogénine (Myog) et de facteurs de transcription comme Mef2 (Sassoon *et al.*, 1989).

2.3. Formation des fibres musculaires par fusion

2.3.1. Les différentes phases de myogenèse

Le muscle squelettique est formé au cours de trois phases successives de myogenèse, bien que chevauchantes, impliquant différents types de myoblastes (Figure 22).

- Lors de la myogenèse primaire (ou embryonnaire), les myoblastes Pax3+ qui se sont délaminés du dermomyotome et ont migré dans les bourgeons de membre se différencient en fibre primaire bien souvent à l'origine des fibres de type I.
- Lors de la myogénèse fœtale, au cours des stades E14.5 et E17.5 chez la souris, les précurseurs musculaires qui résident dans le membre activent l'expression de Pax7, paralogue de Pax3. Ces progéniteurs Pax7+ peuvent se différencier en myocytes pour fusionner avec les fibres primaires ou bien former les fibres secondaires (fœtales) à l'origine généralement des fibres de type II. Autre alternative, les cellules progénitrices Pax7+/MRF- peuvent constituer une source de myoblastes pour la myogenèse post-natale. À E17.5, quelques cellules satellites Pax7+ peuvent déjà être observées sous la membrane basale du muscle (Brohl *et al.*, 2012).
- Après la naissance, les cellules progénitrices fœtales Pax7+ peuvent donner des myoblastes postnataux qui vont permettre la croissance du muscle et des cellules

Table 7. Protéines impliquées dans la fusion des myoblastes des vertébrés

Étape	Acteurs moléculaires		Références
Migration cellulaire	Régulateurs positifs	CD164 Interleukine 4 Récepteur du mannose Mor23	Bae et al., 2008 Horseley et al., 2003 Jansen and Pavlath, 2006 Griffin et al., 2009
	Régulateur négatif	Prostacycline	Bondesen et al., 2007
Adhésion cellulaire	Nephrin Integrin β 1 Jamb/Janc Myomarker		Sohn et al., 2009 Schwander et al., 2003, Powell and Wright, 2011 Millay et al., 2013
Réorganisation du cytosquelette d'actine	Dock1 et Dock 5 Rac1 Nap1 Cdc42 Trio Arf6 Filamin C Graf1		Laurin et al., 2008 Vasyutina et al., 2009 Nowak et al., 2009 Vasyutina et al., 2009 O'Brien et al., 2000 Chen et al., 2003 Dalikilic et al., 2006 Doherty et al., 2011

satellites localisées sous la membrane basale des fibres musculaires impliquées dans la régénération du muscle adulte. Toutes les cellules satellites post-natales ne sont pas Pax7+.

2.3.2. Les acteurs moléculaires de la fusion

La fusion est indispensable pour la formation des fibres musculaires, leur croissance et la régénération du tissu en cas de blessure. Le processus de fusion des myoblastes dans le cadre de la différenciation des fibres est difficile à étudier *in vivo* chez les vertébrés donc bien mieux décrit d'un point de vue moléculaire chez *Drosophila melanogaster* (voir chapitre III.3.4.1). Cependant, le processus global de fusion des myocytes est bien conservé entre les espèces et se fait suivant trois grandes étapes : (i) migration des cellules l'une vers l'autre ou vers un myotube, (ii) reconnaissance et adhésion, puis suite à une réorganisation des membranes et du cytosquelette d'actine, (iii) la fusion à proprement parler.

In vitro, la fusion des myoblastes est stimulée à la fois par des régulateurs positifs et négatifs de la migration cellulaire (Table 7) signifiant que le bon dosage de ces régulateurs est crucial pour la fusion. D'un côté, favoriser la migration augmente la probabilité que deux myoblastes se rencontrent. D'un autre côté, ralentir la migration facilite le contact entre les deux cellules puis leur adhésion.

L'adhésion des myoblastes doit être hautement cellule-spécifique afin d'éviter qu'une cellule non musculaire soit intégrée à un syncytium musculaire. De nombreuses protéines non spécifiques du muscle et qui régulent la fusion des myoblastes ont été identifiées (Table 7). Cependant, seul Myomarker est spécifique de la fusion des myoblastes chez la souris (Millay *et al.*, 2013). Chez le poisson zèbre, le couple de récepteurs membranaires Jamb et Jamc permet la reconnaissance des myoblastes à fusionner entre eux (Powell and Wright, 2011).

La réorganisation du cytosquelette d'actine est nécessaire au processus de fusion et consiste en la formation d'un mur dense en actine parallèlement à l'axe long des myoblastes alignés (Duan and Gallagher, 2009). Au cours de la fusion à proprement parler, des pores se créent au sein de ce mur au niveau des sites d'accumulation de vésicules de part et d'autre de la membrane. L'ensemble de ce processus est sous le contrôle de la myosine 2A non musculaire (Duan and Gallagher, 2009) et Nap1, un composant du complexe de remodelage de l'actine appelé WAVE (Nowak *et al.*, 2009). D'autres facteurs impliqués dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et conservés avec la Drosophile sont présentés dans la Table 7.

2.4. Différenciation terminale et acquisition de la fonction musculaire

Pour être fonctionnels, les muscles doivent s'attacher de manière à résister aux forces de contraction, être innervés et disposer d'un appareil contractile.

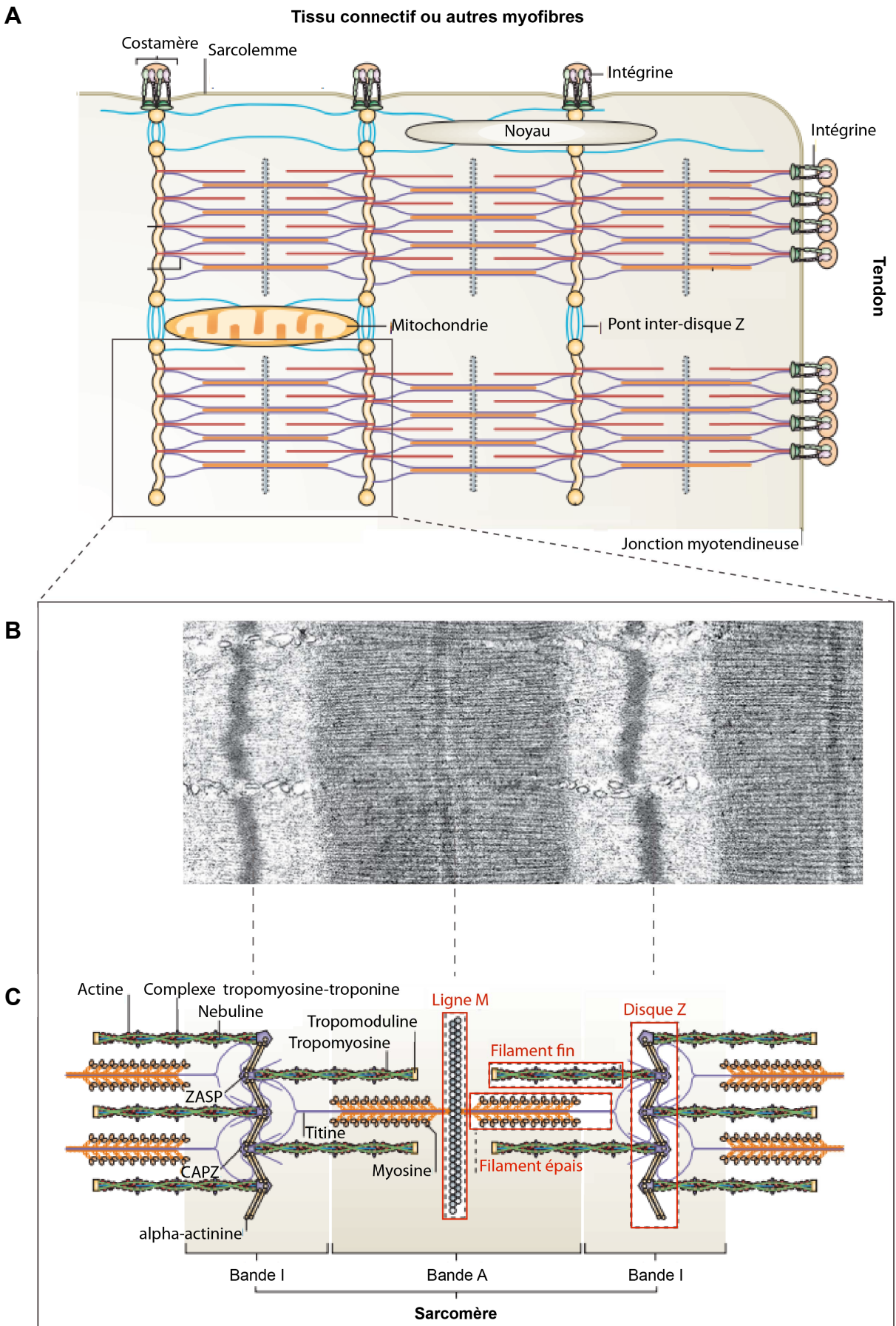


Figure 23. Structure des sarcomères

A) Représentation schématique d'un muscle strié. B) Photographie d'un sarcomère obtenue par microscopie électronique. C) Représentation schématique de la structure du sarcomère et de ses composants.

2.4.1. Acquisition de l'identité musculaire

Les muscles se distinguent les uns des autres par leur taille, leur position et leur innervation. La position des fibres primaires préfigure le site de formation et la taille des fibres secondaires (Patel *et al.*, 2002). Par ailleurs, les orthologues de certains gènes d'identité musculaire existent chez les vertébrés et interviennent dans le développement musculaire de certains types de muscles. Par exemple, chez la souris, *Pitx1* est impliqué dans la détermination de la morphologie des membres postérieurs alors que *Pitx2* est indispensable au bon développement des muscles de la tête (DeLaurier *et al.*, 2006; Shih *et al.*, 2008). *Msx1* et *Msx2* participent à la formation des muscles de la paroi abdominale (Ogi *et al.*, 2005) et *Lbx1* est impliqué dans la migration des progéniteurs des muscles appendiculaires (Brohmann *et al.*, 2000).

2.4.2. Attachement et innervation

L'attachement des fibres musculaires à l'endosquelette se fait par l'intermédiaire de tendons. La formation de ce système musculo-squelettique est nécessaire pour résister aux forces de contraction lors du mouvement, mais ne sera pas développé ici car n'est pas remis en cause dans la DM1.

L'innervation des muscles par les motoneurons permet de commander les mouvements. L'ensemble constitué de la synapse du neurone et de la jonction neuromusculaire du muscle s'appelle plaque motrice. Bien que l'innervation des muscles des vertébrés ait été largement décrite, elle ne sera pas non plus explicitée dans cet exposé.

2.4.3. Formation de l'appareil contractile

En parallèle de l'innervation des myotubes se produit la myofibrillogénèse. Ce terme définit la formation et l'assemblage des myofibrilles, structures cylindriques contractiles présentes d'une extrémité à l'autre de la fibre, reliée à la membrane plasmique par les filaments intermédiaires et dont l'unité contractile de base est le sarcomère.

- *Structure des sarcomères*

L'organisation répétée caractéristique des myofibrilles est à l'origine de l'appellation générique « muscle strié » donnée au tissu qu'elles composent. En effet, leur apparence en microscopie électronique révèle une striation transversale périodique due à l'alternance de bandes claires (ou I pour isotropes) et sombres (ou A pour anisotropes). Les bandes I et A présentent, en leur milieu respectif, le disque Z et la ligne M (Figures 23). Ainsi, le sarcomère est un segment de myofibrille délimité par deux bandes Z qu'il partage avec les sarcomères adjacents :

- La ligne Z à chacune des extrémités est composée d' α -actinine. Elle sert de point d'ancrage aux filaments fins et est au centre de la bande I contenant les filaments fins exclusivement.
- Les filaments fins constitués de filaments d'actine (actine F) associés aux complexes tropomyosine et troponine sont les composants majoritaires de la bande I. Les filaments fins possèdent une extrémité plus et une extrémité moins, selon la vitesse de polymérisation de l'actine F, recouverte respectivement par CAPZ et la tropomoduline. La longueur des filaments fins est régulée par la nebuline (Witt *et al.*, 2006).
- Les filaments épais sont associés aux lignes M et Z par l'intermédiaire de la protéine « géante » titine et constituent la bande A (Trinick, 1996). En plus de son rôle dans l'ancrage des filaments épais, la protéine titine permettrait de réguler la plasticité du sarcomère (Labeit and Kolmerer, 1995).

À chacune de leurs extrémités, les myofibrilles s'attachent au squelette au niveau des jonctions myo-tendineuses composées principalement d'hétérodimères d'intégrines qui font la jonction entre les filaments fins et la matrice extracellulaire (MEC). À l'intérieur d'une cellule musculaire, les myofibrilles qui se trouvent en périphérie s'attachent également à la MEC au niveau de leurs lignes Z par l'intermédiaire de sites d'adhésion appelés costamères, dont la constitution est proche de celle des jonctions myo-tendineuses.

- *Modèles de l'assemblage des myofibrilles*

La formation d'un tissu musculaire strié nécessite plus que la simple expression séquentielle des gènes sarcomériques. Trois modèles basés sur des observations microscopiques ont été proposés pour décrire l'assemblage des composants sarcomériques en myofibrille mature :

- (i) Le modèle du patron selon lequel des structures de type fibre de stress jouent le rôle de gabarit ou d'échafaud pour l'assemblage des myofibrilles (Dlugosz *et al.*, 1984).
- (ii) Le modèle dit « de couture » suggère que les complexes I-Z-I comprenant les filaments fins se formeraient avant les filaments épais de myosine et de manière totalement indépendante, puis s'additionneraient ensuite de manière alternative avec des filaments de myosine aux extrémités de myofibrilles déjà existantes (Prent *et al.*, 2008; Nucciotti *et al.*, 2010).
- (iii) Le modèle des pré-myofibrilles consiste en la formation en trois étapes des myofibrilles : les pré-myofibrilles, les myofibrilles naissantes et les myofibrilles matures (Sparrow and Schock, 2009).

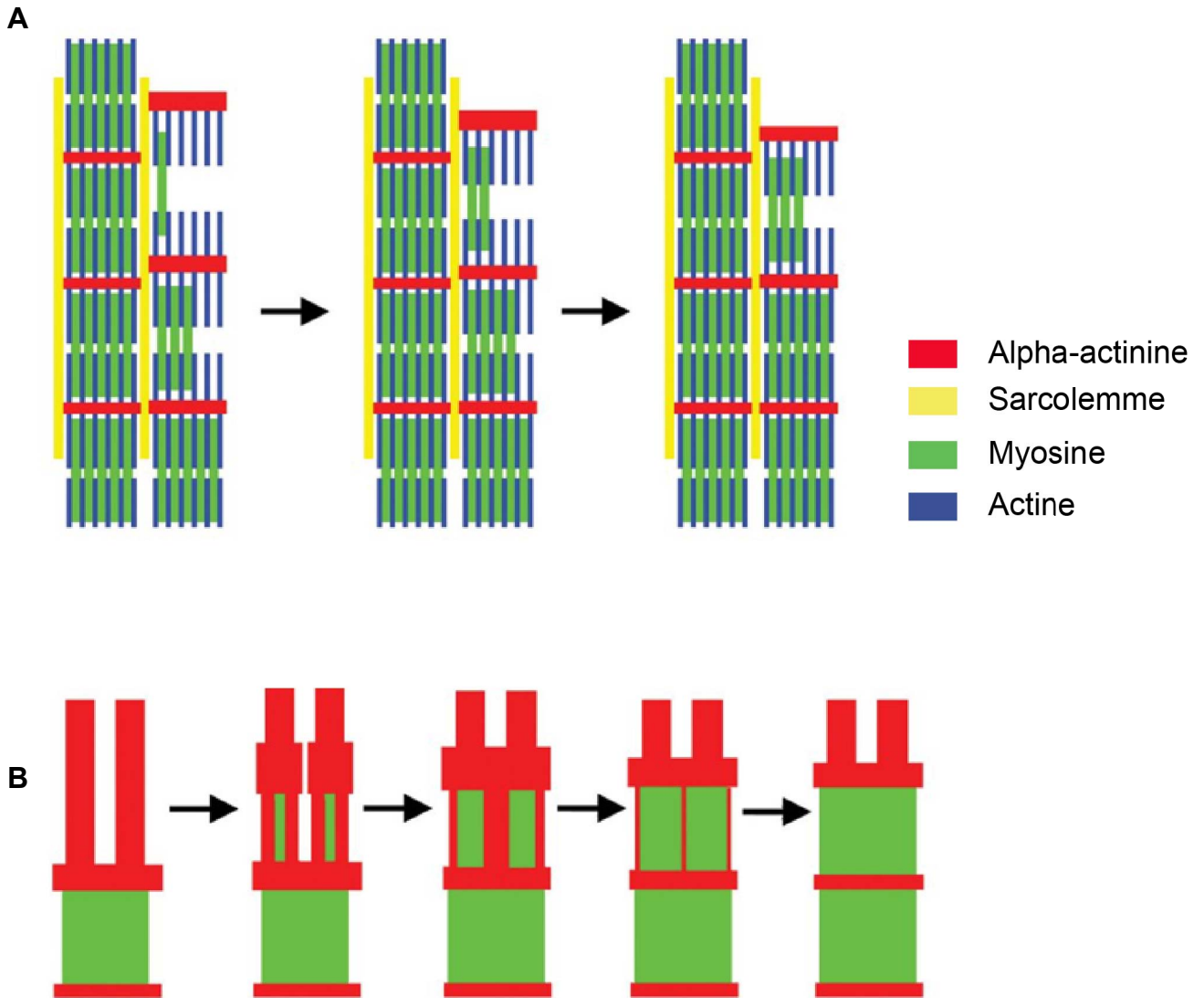


Figure 24. Modèle de l'assemblage des filaments de myosine avec les myofibrilles

A) Les filaments de myosine s'intègrent un à un selon l'axe perpendiculaire au sens d'élongation du myotube. Les disques Z s'alignent et s'affinent au fur et à mesure de l'intégration de la myosine. B) L'assemblage des filaments de myosine divise la pré-myofibrille, réarrange l'alpha-actinine au niveau des disques Z et élimine l'alpha-actinine des bandes A.

C'est ce dernier modèle que je souhaite détailler car de récentes observations en microscopie biphotonique le confortent et le complètent (Liu *et al.*, 2013). Cependant, ces modèles ne sont pas mutuellement exclusifs et peuvent être coordonnés pour expliquer la formation des sarcomères. C'est notamment le cas des pré-myofibrilles qui sont similaires aux fibres de stress évoquées dans le premier modèle.

La formation des sarcomères peut être divisée en deux phases : une première phase dépendante des intégrines et une seconde phase dépendante de la contraction musculaire.

Lors de la première phase, il y a formation de précurseurs des disques Z appelés Z bodies. Ces Z bodies sont en fait de petits agrégats d' α -actinine et de titine associés à la membrane (Tokuyasu and Maher, 1987). Les sites d'adhésion à la membrane constitués d'intégrines se forment dans un premier temps de manière aléatoire et sont appelés protocostamères car sont supposés être les précurseurs des costamères. Au niveau de ces sites, les filaments d'actine se polymérisent pour former les pré-myofibrilles. L' α -actinine présente dans les Z-bodies et visualisable sous forme de spots va s'étendre latéralement dans les pré-myofibrilles et également relier entre eux deux filaments d'actine de polarité inverse.

Alors que les filaments d'actine se forment en périphérie le long de la membrane, il a été montré récemment qu'au contraire, les filaments de myosine sont d'abord incorporés aux pré-myofibrilles les plus centrales au cours de la seconde phase (Liu *et al.*, 2013). Lors de cette phase, la contraction de la fibre nécessaire à l'arrangement régulier des composants sarcomériques est d'autant plus intense que la myosine est ajoutée pour former les sarcomères. La myosine, incorporée aux pré-myofibrilles grâce à des protéines chaperonnes telles que Unc-45, Hsp70 et Hsp90 (Barral *et al.*, 1998; Hawkins *et al.*, 2008), est dans un premier temps la myosine II non musculaire. Elle sera remplacée lors de la maturation de la myofibrille par la myosine II musculaire (Rhee *et al.*, 1994). Au fur et à mesure de la maturation, de nombreuses myofibrilles sont déplacées vers l'intérieur et les protocostamères mûrissent en costamères ou ponts inter-disques Z (Figures 23). L'intégration de la myosine dans les sarcomères se fait perpendiculairement au sens d'élongation de la myofibrille et de proche en proche (Figure 24A). Par ailleurs c'est la myosine, par son intégration, qui finalise la maturation des Z bodies en disques Z (Figure 24B) (Liu *et al.*, 2013). En effet, il semblerait que les pré-myofibrilles initialement alignées (en rouge sur la figure 24B) soient divisées en deux par l'incorporation des filaments de myosine permettant ainsi d'éliminer l' α -actinine de la bande A et de la condenser au niveau des disques Z.

2.4.4. La contraction musculaire

La contraction musculaire résulte de l'action coordonnée des cellules du muscle. La contraction des fibres musculaires provient quant à elle du glissement des myofilaments d'actine sur les myofilaments de myosine. L'énergie nécessaire à ce glissement est fournie par l'hydrolyse de l'ATP sous l'action enzymatique de la myosine elle-même. La fenêtre d'action de

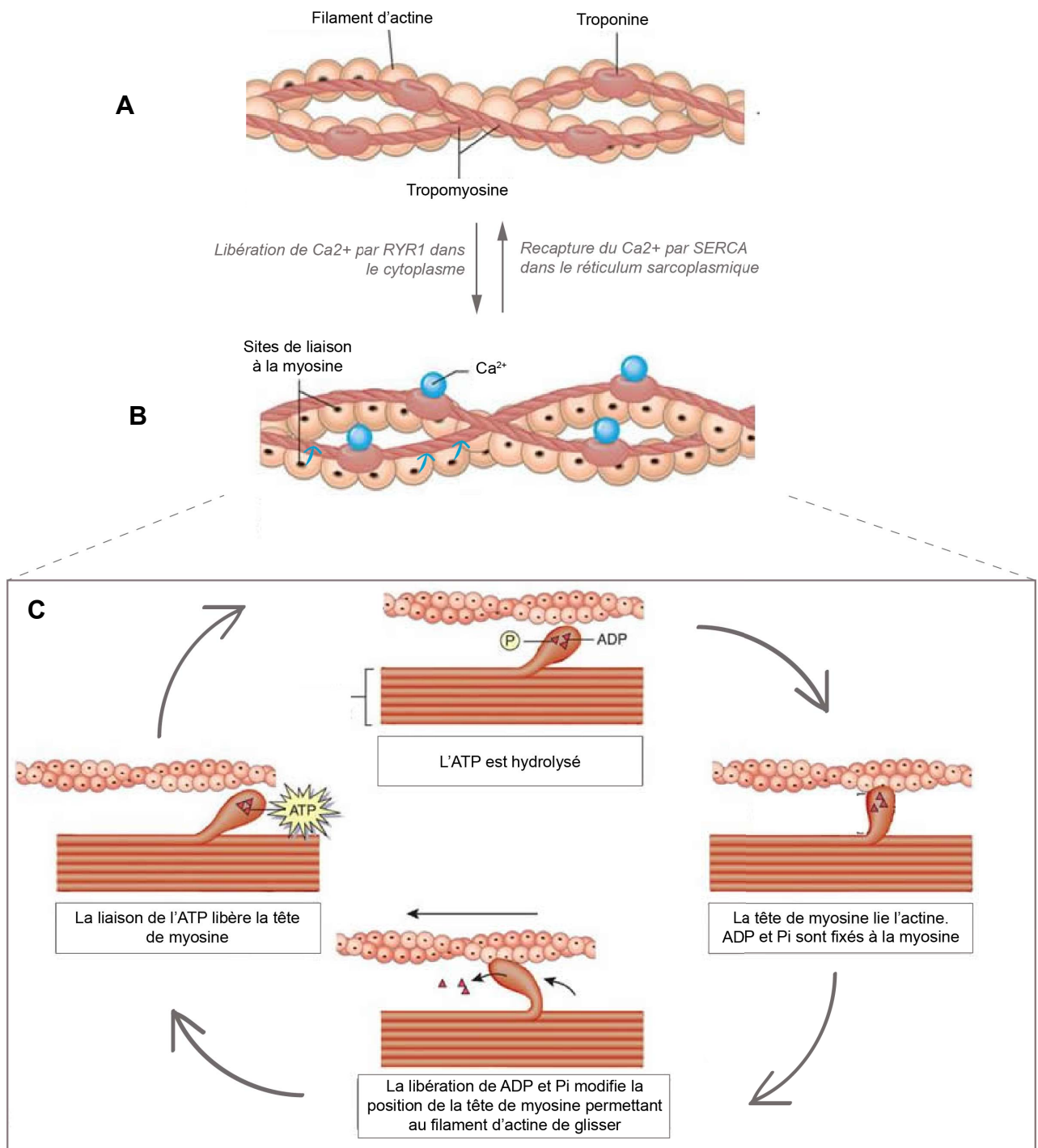


Figure 25. La contraction musculaire

A) Lorsque le muscle est relâché, le complexe troponine-tropomyosine recouvre les sites de liaison à la myosine présents sur les filaments fins d'actine. B) La libération d'ions calciques par le réticulum sarcoplasmique permet au muscle de se contracter. Les ions calciques se fixent sur la troponine modifiant la position de la tropomyosine et révélant les sites de liaison à la myosine. C) Etapes de l'interaction entre actine et myosine permettant le glissement des filaments fins sur les filaments épais et donc le raccourcissement des sarcomères.

D'après <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio110/chap07/chap07.html>

la myosine permettant la contraction est déterminée par la concentration cytoplasmique d'ions calciques (Ca^{2+}). Les détails moléculaires de la contraction musculaire sont donnés ci-après.

Un potentiel d'action provenant d'un motoneurone se propage dans le muscle à travers un réseau de tubules T qui s'étend jusque dans le cytoplasme. La dépolarisation active les canaux calciques voltage-dépendants DHPRs localisés dans la membrane des tubules T. L'activation modifie la conformation des DHPRs qui activent mécaniquement et lentement la sous-unité $\alpha 1\text{S}$ des RYR1s localisés dans la membrane de réticulum sarcoplasmique (RS) adjacents aux tubules T. La conséquence de l'activation des RYR1s est la libération de Ca^{2+} par le RS dans le cytoplasme. Ca^{2+} lie la troponine C présente sur les filaments fins d'actine. Cette liaison modifie la conformation spatiale de la tropomyosine qui lui est associée permettant d'exposer les sites de liaison à la myosine présents sur l'actine (Figure 25 A et B). La myosine, dont la poche de liaison des nucléotides est occupée par une molécule d'ADP et un phosphate inorganique (Pi) est prête pour l'action. Elle lie sa tête à un site de liaison devenu accessible sur le filament d'actine. Cette nouvelle liaison libère le Pi et permet à la myosine de tirer sur le filament d'actine, rapprochant ainsi les disques Z les uns vers les autres. La libération de l'ADP et du Pi permet à une molécule d'ATP de venir occuper la poche nucléotidique de la myosine, ce qui la détache de l'actine. La myosine hydrolyse ensuite l'ATP et utilise l'énergie générée pour se remettre dans une conformation propice pour lier une nouvelle molécule d'actine. Les cycles de liaison/libération de la tête de myosine se poursuivent tant que l'ATP est disponible et que du Ca^{2+} est fixé sur la troponine C. Alors que la contraction est en cours, le calcium est activement recapturé par SERCA pour être restocké dans le RS, ce qui mène finalement au retrait du Ca^{2+} de la troponine. Ainsi, le complexe troponine-tropomyosine retrouve sa conformation initiale couvrant les sites de liaison à la myosine de l'actine et le muscle se relâche.

3. Conservation des mécanismes et des bases moléculaires de la myogenèse chez *Drosophila melanogaster*

Il existe de nombreuses similarités entre la biologie de la Drosophile et des vertébrés faisant de la Drosophile un organisme modèle pour l'étude des processus de développement tels que la myogenèse. On remarque notamment une conservation des grandes étapes et des signaux conduisant à la formation des muscles. Cette partie ne présentera pas de façon exhaustive la myogenèse de la Drosophile. Il s'agira davantage d'une réflexion sur les similitudes et les différences entre myogenèse de la Drosophile et myogenèse des vertébrés.

3.1. Plusieurs vagues de myogenèse

Chez la Drosophile, l'équivalent des muscles squelettiques vertébrés sont les muscles somatiques. Ils se forment au cours de deux vagues successives de myogenèse au cours de la

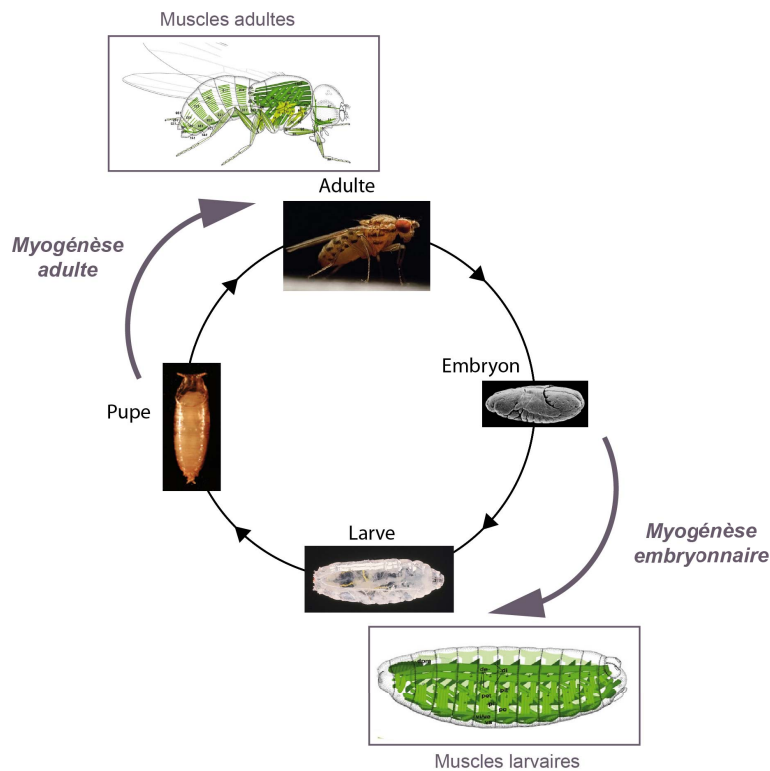


Figure 26. Développement des muscles somatiques chez la Drosophile

Les muscles se forment en deux vagues successives de myogénèse. La première, au cours de l'embryogénèse, permet la formation des muscles larvaires. La seconde aboutit au développement des muscles de la mouche adulte.

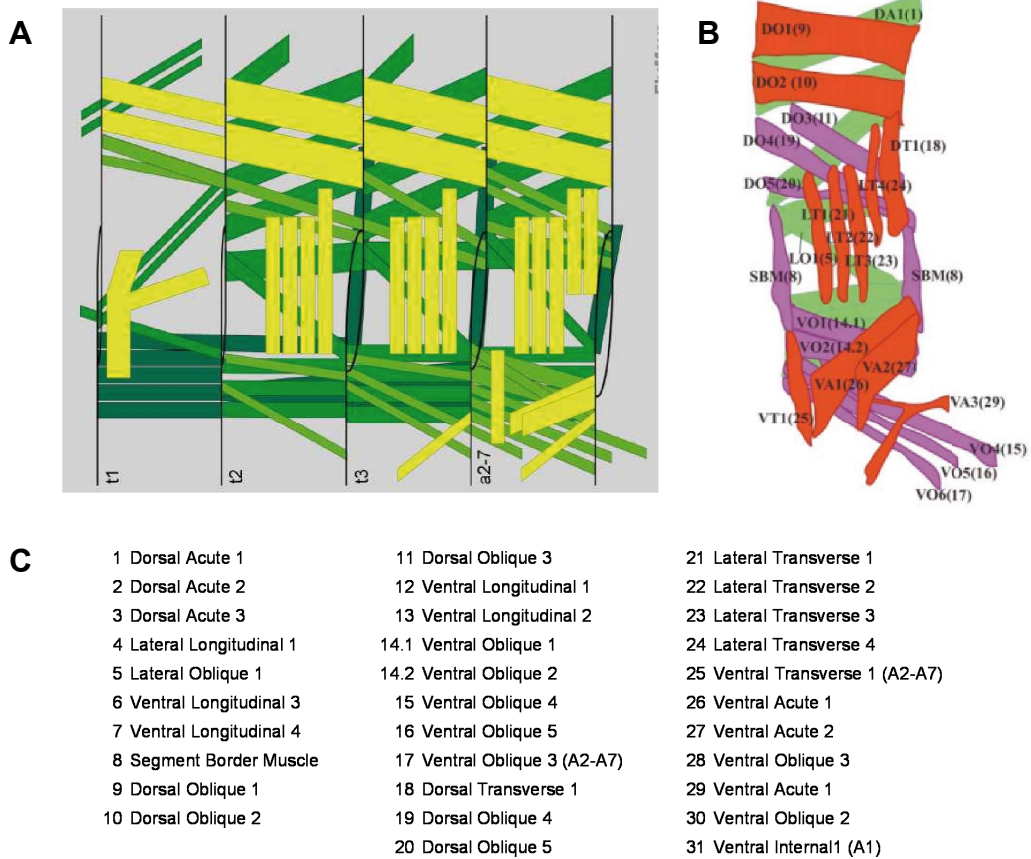


Figure 27. Structure des muscles embryonnaires de la Drosophile.

A) Représentation schématique du patron musculaire en fonction des segments thoraciques (T1, T2, T3) et abdominaux (A2 à A7). B) Représentation schématique et C) nomenclature du patron musculaire somatique dans un segment abdominal.

vie de la mouche (Figure 26), ce qui n'est pas sans rappeler les vagues de myogenèse embryonnaire, foétale et post-natale des vertébrés.

Dans le cas de la *Drosophile*, la première vague de myogenèse a lieu au cours de l'embryogenèse et va permettre la génération des muscles larvaires. Lors de la seconde vague de myogenèse au cours du stade pupal, la majorité des muscles larvaires s'histolyse. La création des muscles adultes s'effectue ensuite soit par fusion de cellules Précurseurs du Muscle Adulte (AMP) avec les fibres larvaires non histolysées, soit par fusion des cellules AMP entre elles pour permettre la formation *de novo* des muscles adultes.

Les muscles larvaires produits au cours de l'embryogenèse vont croître tout en assurant la locomotion de la larve. Ils sont chacun constitués d'une seule fibre musculaire multinucléée. L'embryon de *Drosophile* possède une structure segmentée et chacun de ces segments comprend jusqu'à une trentaine de muscles différents organisés de manière stéréotypée, avec un patron musculaire similaire pour les segments abdominaux A2 à A7 (Bate, 1990) (Figure 27). Chacun de ces muscles est identifiable par sa taille, sa position, son orientation selon les axes antero-postérieur et dorso-ventral, le nombre de noyaux qu'il possède, ses sites d'attachement à l'épiderme et son innervation (Bate and Rushton, 1993). Dans la littérature, les muscles larvaires monofibrillaires de la *Drosophile* sont sans cesse comparés aux muscles squelettiques vertébrés post-nataux qui sont multifibrillaires. Ce qui, bien évidemment, souligne leur différence. Pour ma part, je pense que les muscles larvaires rappellent les fibres primaires issues de la myogénèse embryonnaire des vertébrés, et ceci pour trois raisons : (i) ce sont les toutes premières fibres formées de l'organisme lors d'une première phase de myogénèse. (ii) que ce soit chez le vertébré ou la *Drosophile*, il s'agit d'une seule fibre musculaire multinucléée. Enfin (iii), elles serviront par la suite de base à la construction de muscles multifibrillaires. Par déduction, on peut comparer les muscles de la *Drosophile* adulte qui sont multifibrillaires et mis en place lors de la seconde vague de myogénèse aux muscles des vertébrés issus de la myogénèse foétale et/ou post-natale. Enfin, les cellules AMP de la *Drosophile* qui servent à la formation des muscles adultes sont comparées aux cellules satellites des vertébrés (Figeac *et al.*, 2007).

La myogenèse embryonnaire de la *Drosophile* peut être divisée en trois grandes étapes : la détermination du mésoderme somatique, les étapes de diversification initiales et l'acquisition de propriétés musculaires distinctes (Tixier *et al.*, 2010) (Figure 28). La conservation de la myogenèse embryonnaire n'est pas linéaire et varie au sein de chacune de ces phases ce que je vais développer par la suite.

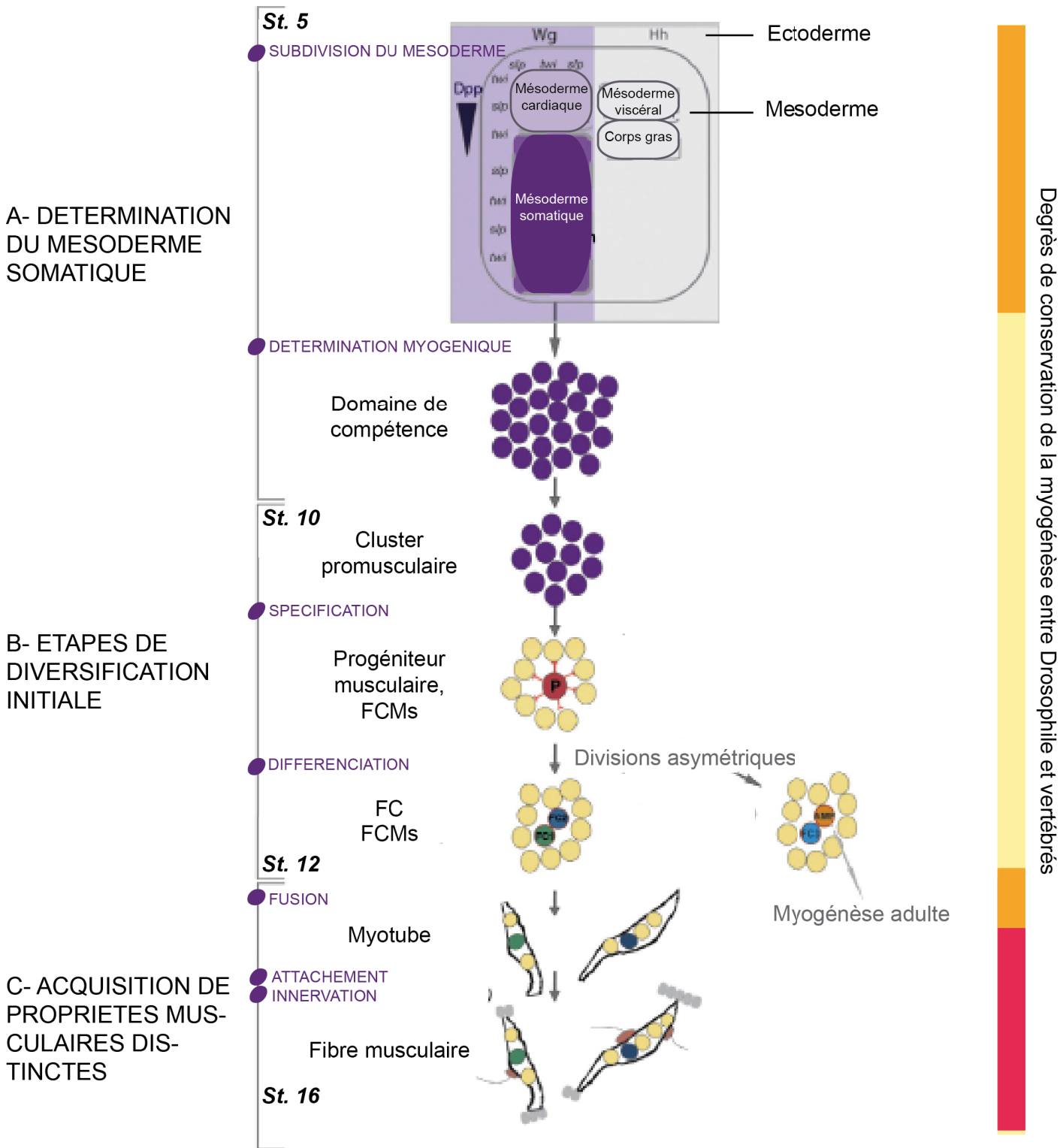


Figure 28. Les grandes étapes du processus myogénique.

La myogénèse embryonnaire peut être décomposée en trois temps regroupant les étapes précoces, intermédiaires et tardives. Le degré de conservation de la myogénèse embryonnaire est d'autant plus important que la couleur est saturée en rouge. La conservation des mécanismes ou des acteurs moléculaires de la myogénèse n'est pas linéaire sur l'ensemble processus ou au sein des grandes étapes.

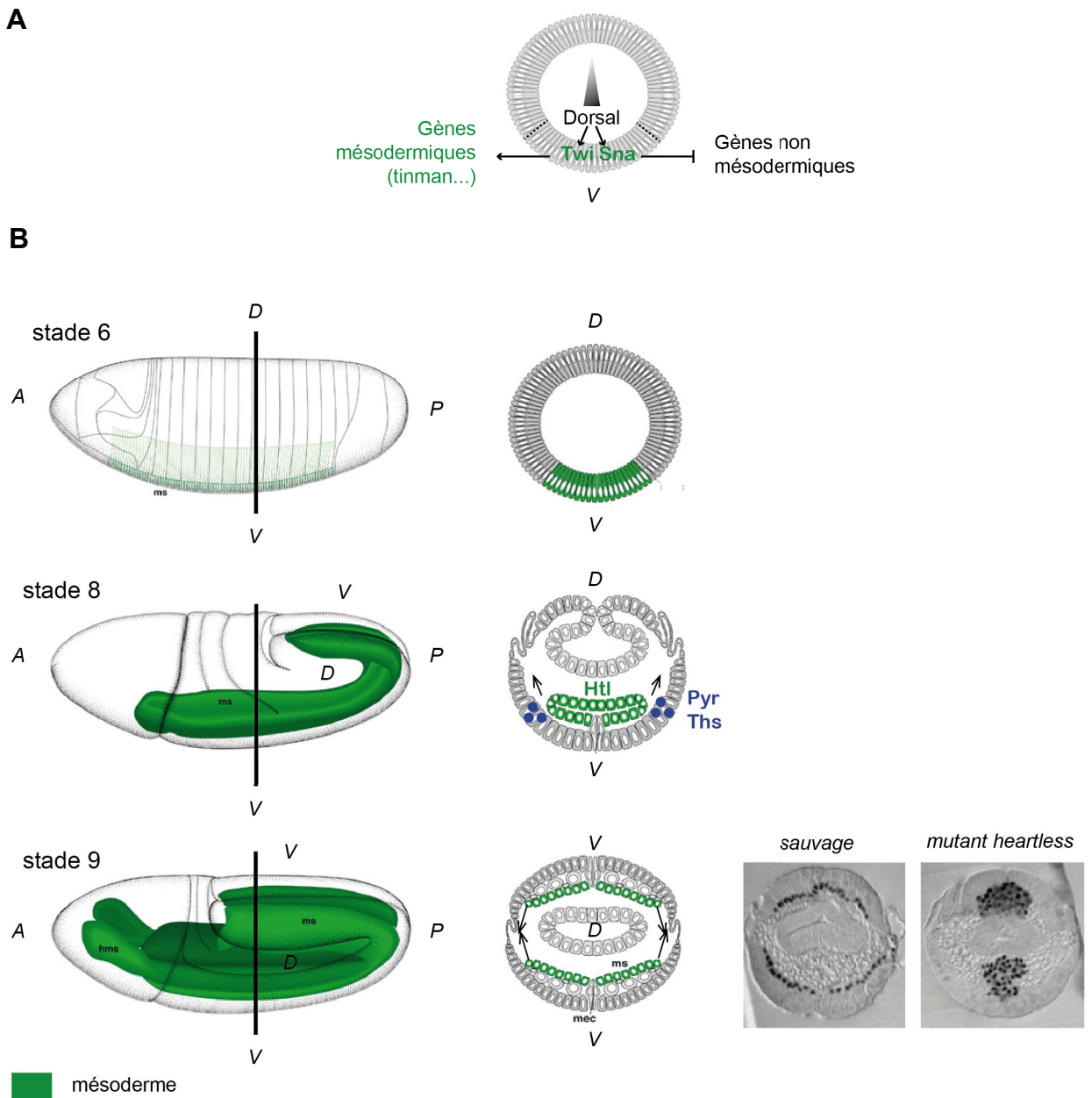


Figure 29. Détermination et migration du mésoderme

A) Le mésoderme est déterminé ventralement par une forte concentration de la protéine Dorsal qui active Twist et Snail. Twist active l'expression de gènes impliqués dans le programme myogénique alors que Snail réprime l'expression des gènes non mésodermiques. B) Une fois déterminé, le mésoderme s'invagine à l'intérieur de la cavité embryonnaire. Les ligands, Thisbe (Ths) et Pyramus (Pyr) exprimés au niveau du neuroectoderme se fixent sur le récepteur Heartless (Htl) exprimé au niveau des cellules mésodermiques, ce qui induit leur migration vers la partie dorsale. A : Antérieur; P: Postérieur; V : Ventral; D : Dorsal

D'après Hartenstein, 1993, *Atlas of Drosophila development*

3.2. Etapes précoces de la myogenèse embryonnaire : conservation des signaux moléculaires avec la myogenèse vertébrée

Les premières étapes de la formation des muscles somatiques/squelettiques montrent un grand nombre de similarités entre *Drosophila* et vertébrés. Bien que les structures desquelles émergent les fibres musculaires soient différentes elles ont en commun :

- une identité différente le long de l'axe antéro-postérieur permise par l'expression des gènes homéotiques qui vont permettre de générer soit des profils musculaires segment-spécifique dans le cas de la *Drosophila*, soit des types de muscles différents dans le cas des vertébrés
- un processus de subdivision impliquant l'action combinée de plusieurs facteurs dont la majorité est conservée et provient de tissus adjacents

3.2.1. Détermination du mésoderme et migration

Dans l'embryon précoce de *Drosophila*, le mésoderme est formé au cours de la gastrulation. Il est déterminé en position ventrale de l'embryon au stade blastoderme par une forte concentration de la protéine Dorsal qui induit les facteurs de transcription Twist (Twi) et Snail (Sna) (Thisse *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 1992). Twi active l'expression de nombreux gènes impliqués dans le programme myogénique (Sandmann *et al.*, 2007). Parmi eux, le gène *tinman* (*tin*) permet le développement du mésoderme somatique dorsal et des dérivés viscéraux et cardiaques (Azpiazu and Frasch, 1993). Sna a pour fonction de limiter l'extension des territoires voisins tel que le neurectoderme, en réprimant des gènes qui contrôlent leur développement (Leptin, 1991). Ainsi, l'action combinée de Sna et Twi permet de déterminer précisément la région ventrale de l'embryon qui adoptera une identité mésodermique (Figure 29A).

En parallèle à l'élongation de la bande germinale, les cellules mésodermiques nouvellement déterminées s'invaginent et migrent dorsalement jusqu'à former une monocouche sous-jacente à l'épiderme (Leptin and Grunewald, 1990). Ce processus de migration est sous contrôle de l'expression du facteur mésodermique de la famille FGF Heartless (Htl) et de ses ligands Thisbe (Ths) et Pyramis (Pyr) au niveau du neurectoderme (Shishido *et al.*, 1997; Stathopoulos *et al.*, 2004) (Figure 29B).

3.2.2. Subdivision du mésoderme

Suite à la migration, le mésoderme est subdivisé dans chaque segment en quatre domaines principaux selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral. La spécification des dérivés mésodermiques à l'origine des muscles viscéraux, somatiques, cardiaques et du corps gras (analogue fonctionnel du foie vertébré) se fait par une régionalisation du mésoderme sous l'influence de signaux d'origine ectodermique et de gènes sélecteurs mésodermiques (Figure 30) :

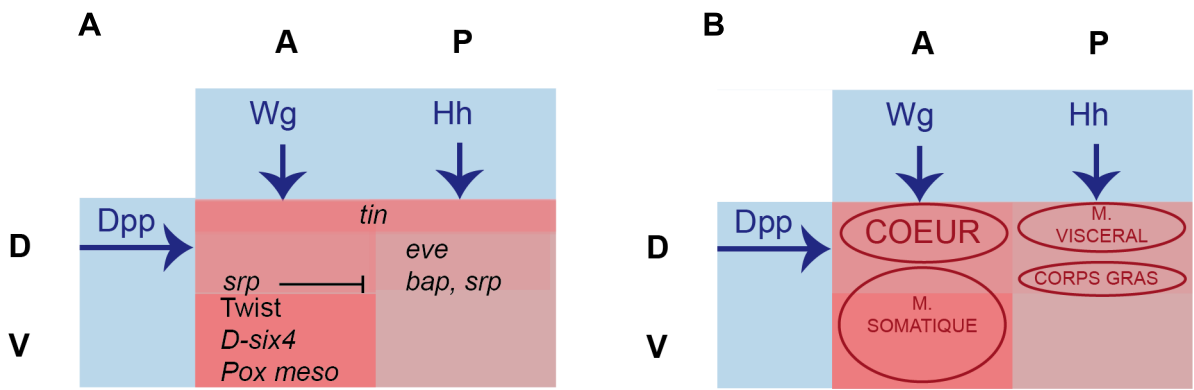


Figure 30. Subdivision du mésoderme de la Drosophile

A) Les signaux ectodermiques Wg, Hh, Dpp (bleu) permettent la subdivision du mésoderme selon les axes antero-postérieur et dorso-ventral. La subdivision suivant l'axe antero-postérieur s'effectue par la modulation de l'expression de Twist et tinman respectivement contrôlée par srp et Dpp. Les gènes sélecteurs mésodermiques (noir) participent à la spécification des territoires mésodermiques. B) La forte expression de twist en antérieur permet la formation du cœur et de la musculature somatique dorsale. La faible expression de Twist en postérieur favorise le développement de la musculature viscérale et du corps gras. A : antérieur ; P : postérieur ; D : dorsal ; V : ventral ; Wg : Wingless ; Hh : Hedgehog ; Dpp : Decapentaplegic ; tin : tinman ; srp : serpent ; eve : even-skipped ; bap : bagpipe .

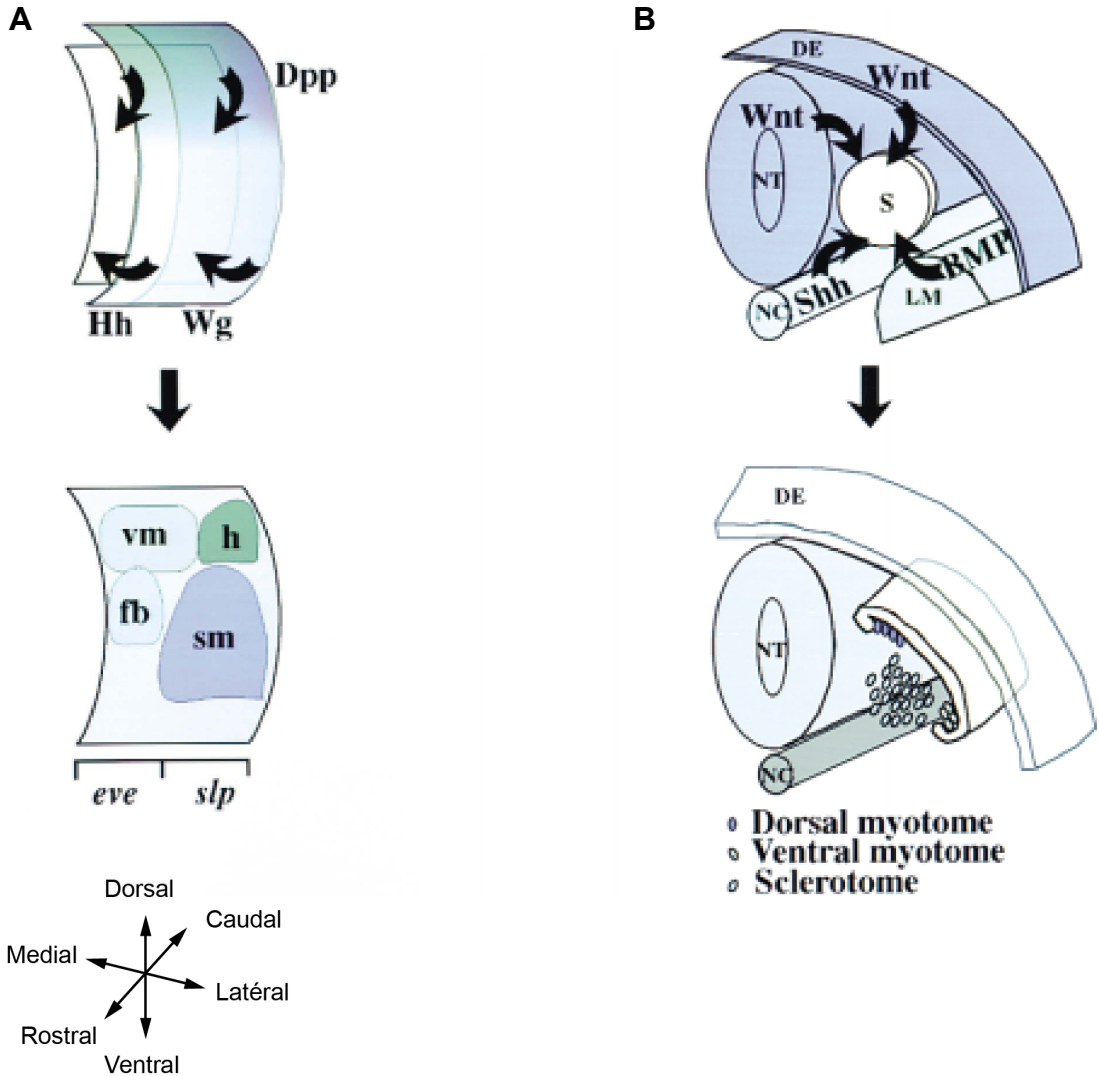


Figure 31. Comparaison entre la subdivision du mésoderme de la Drosophile (A) et des somites des vertébrés (B).

Les gènes *Wnt*, *Shh* et *BMP* intervenant dans la subdivision des somites sont respectivement les orthologues des gènes *Wg*, *Hh* et *Dpp* impliqués dans la subdivision du mésoderme de la Drosophile.

- La limite antéro-postérieure de chaque segment est respectivement déterminée par les signaux ectodermiques Wingless (Wg) et Hedgehog (Hh). En postérieur, Hh induit l'expression de *even-skipped* qui spécifie le mésoderme viscéral et de *bagpipe* (*bap*) et *serpent* (*srp*) qui spécifient le corps gras (Azpiazu and Frasch, 1993; Azpiazu *et al.*, 1996). En antérieur, Wg induit l'expression du gène *sloppy-paired* (*slp*) qui réprime l'expression de *bap* et *srp* (Azpiazu *et al.*, 1996) et permet de maintenir un niveau élevé de Twi (Lee and Frasch, 2000) favorisant la spécification des muscles somatiques et cardiaque.
- La subdivision dorso-ventrale du mésoderme de chaque segment dépend de l'expression du facteur ectodermique Decapentaplegic (Dpp) (Frasch, 1995) sécrété uniquement dans la partie dorsale. Dpp permet de maintenir l'expression de *tin* dans le mésoderme dorsal seulement, déterminant la formation du muscle cardiaque et des muscles somatiques dorsaux (Azpiazu and Frasch, 1993). Dans la partie ventrale, les facteurs de transcription Pox meso et D-six4 sont impliqués dans la détermination de muscles somatiques latéraux, ventraux et du corps gras (Clark *et al.*, 2006; Duan *et al.*, 2007).

La subdivision des somites vertébrés sous l'influence des signaux BMP, Wnt et Shh correspond à la subdivision du mésoderme chez la Drosophile sous l'influence de leur orthologue respectif Dpp, Wg et Hh (Figure 31). En ce qui concerne leurs fonctions, elles sont difficiles à comparer du fait de la différence d'anatomie entre le mésoderme de la Drosophile et les somites des vertébrés. Cependant, on peut relever des similarités dans les modes d'action et les interactions entre ces signaux. Par exemple, chez la Drosophile, les signaux Wg et Hh sont antagonistes dans la division antéro-postérieure des segments mésodermiques, tout comme les signaux Wnt et Shh s'opposent dans la division dorso-ventrale du somite (Azpiazu *et al.*, 1996; Brent and Tabin, 2002). On observe également une similarité d'action des signaux Dpp et BMP. En effet, bien que le signal BMP ne soit pas directement impliqué dans la dorsalisation du somite, comme l'est Dpp dans le mésoderme de la Drosophile, il a été montré que BMP active les signaux Wnt, qui eux dorsalisent les somites (Frasch, 1995; Marcelle *et al.*, 1997).

3.3. Etapes intermédiaires de la myogenèse : une voie mais deux processus de différenciation différents entre Drosophile et vertébré

La diversification des cellules musculaires de la Drosophile emprunte comme pour n'importe quelle cellule de n'importe quelle espèce la grande voie cellule progénitrice, spécification, détermination, différenciation. Cependant, bien que la voie soit la même entre cellules musculaires de Drosophile et cellules musculaires de vertébré, les processus mis en jeu et les facteurs impliqués sont bien différents.

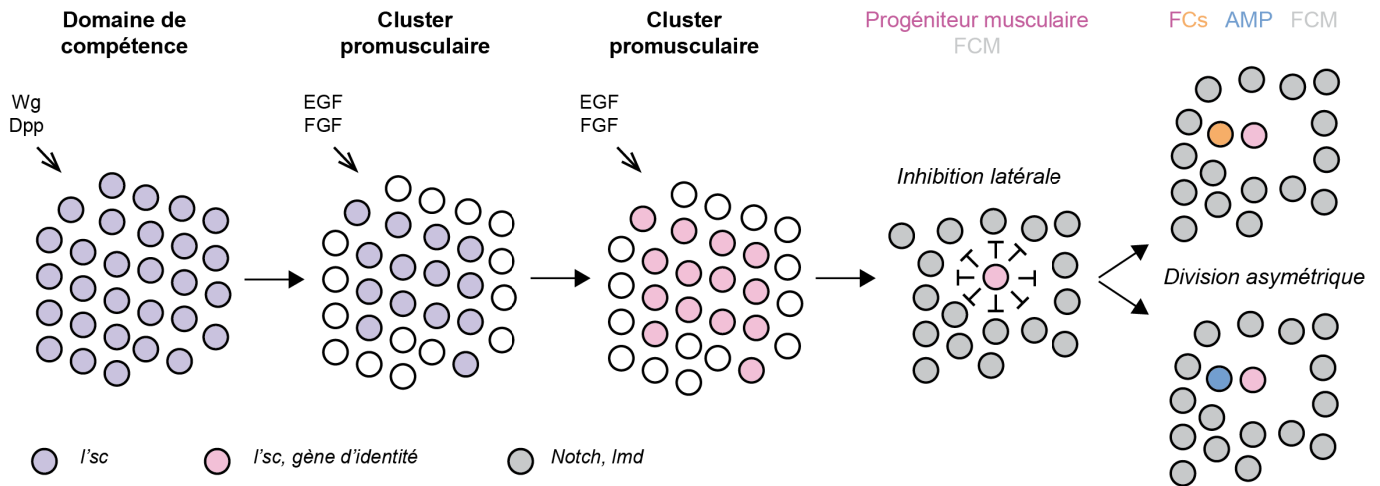


Figure 32. Formation des clusters promusculaires et détermination des myoblastes

Sous l'influence de Wg et Dpp, il y a formation des domaines de compétence exprimant *l'sc*. La voie MAPK permet ensuite de restreindre l'expression de *l'sc* dans les cellules du cluster promusculaire et d'induire celle des gènes d'identité. L'inhibition latérale médiée par la voie Notch permet la spécification d'un progéniteur musculaire par cluster qui se divise ensuite de manière asymétrique afin de former les FC et/ou les AMPs.

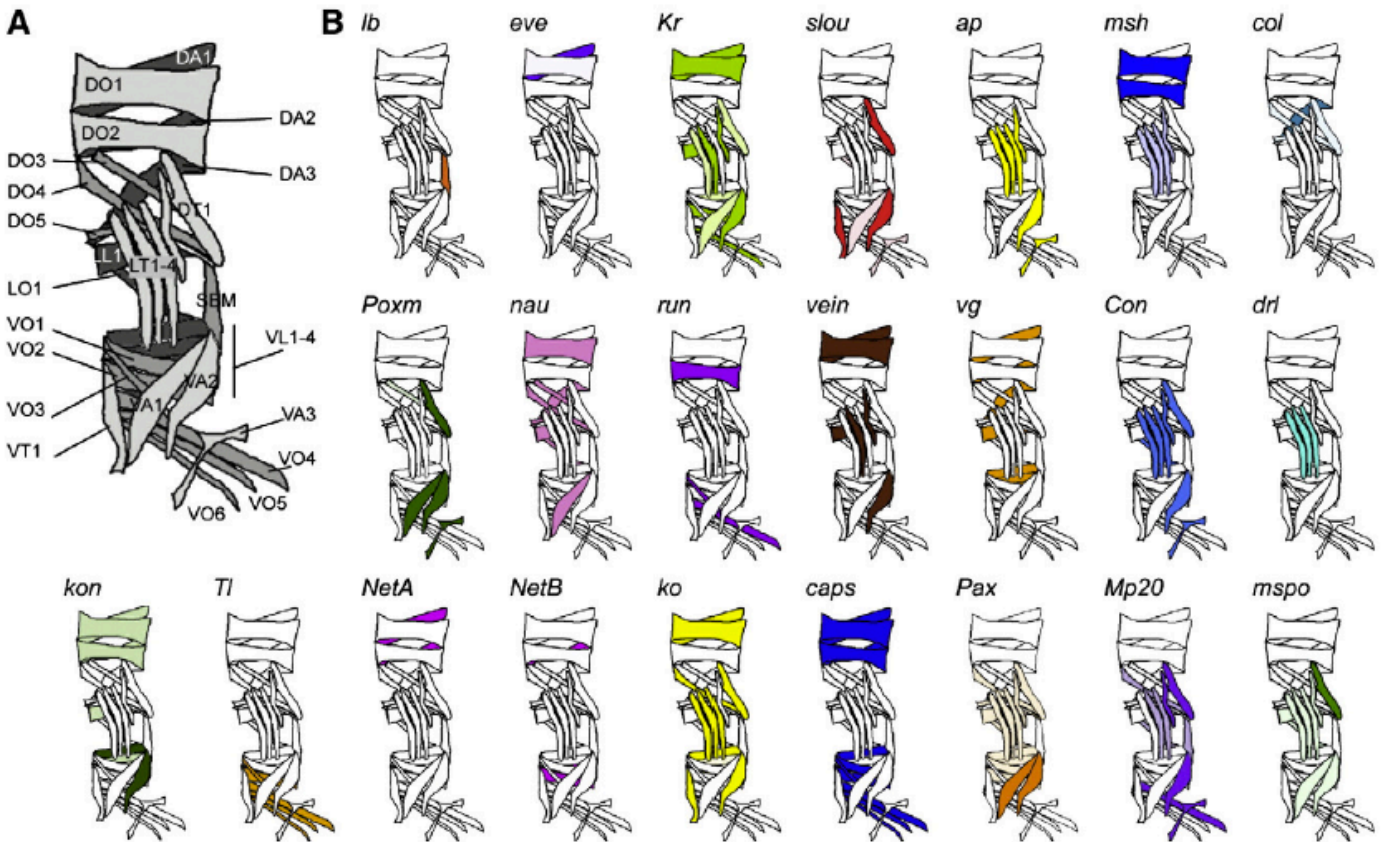


Figure 33. Expression des gènes d'identité dans les muscles embryonnaires

(A) Représentation schématique des muscles embryonnaires dans un segment et expression des gènes d'identité dans chacun de ces muscles (B).

Chez la Drosophile, le processus de spécification détaillé ci-dessous consiste en la formation de clusters promusculaires à partir du mésoderme somatique, puis en la détermination, au sein de ce groupe de cellules, des différents types de myoblastes.

3.3.1. Formation des clusters promusculaires

Au départ, dans le mésoderme somatique, un groupe de cellules rassemblées en un domaine de compétence expriment le gène *lethal of scute* (*l'sc*) grâce aux signaux Wg et Dpp (Carmena *et al.*, 1995). Par la suite, l'activation de la voie MAPK (Mitogen-activated protein kinase) *via* les récepteurs FGF (Fibroblast Growth Factor) et EGF (Epidermal Growth Factor) permet de restreindre l'expression de *l'sc* à quelques cellules afin de former des clusters promusculaires (Figure 32) (Buff *et al.*, 1998; Carmena *et al.*, 1998a; Carmena *et al.*, 1998b; Michelson *et al.*, 1998).

3.3.2. Détermination des myoblastes

Ensuite, au sein de chaque cluster, une seule cellule va être spécifiée en progéniteur musculaire. Ce progéniteur maintient l'activité de la voie MAPK provoquant l'activation de la voie Notch dans les cellules adjacentes permettant une inhibition latérale (Carmena *et al.*, 2002). L'activation de la voie de signalisation Notch dans les cellules voisines inhibe ainsi *l'sc* et l'activité MAPK et permet au contraire l'expression de gènes spécifiques du programme des myoblastes compétents à la fusion (FCMs) tels que *lame duck* (*lmd*) (Duan *et al.*, 2001). A l'inverse dans le progéniteur musculaire, le maintien d'activité MAPK permet l'expression de *l'sc* et des gènes d'identité.

Le progéniteur musculaire va se diviser, bien souvent de manière asymétrique (Ruiz Gomez and Bate, 1997) et peut donner naissance à (i) deux cellules fondatrices du muscle (FC), ou (ii) une FC et une cellule AMP ou encore à (iii) une FC et une cellule péricardiaque.

Seule la FC maintient l'expression des gènes d'identité suite à la division cellulaire. Ces gènes d'identité codent pour des facteurs de transcription qui contrôlent l'identité musculaire de la future fibre. Ils présentent des profils d'expression variés et dynamiques au cours du développement. Certains gènes comme *ladybird* (*lb*), *eve* et *collier* (*col*) sont spécifiquement exprimés dans un seul type de FC et par conséquent dans le muscle qui en résulte. D'autres fibres au contraire expriment une combinatoire de facteurs de transcription plus largement exprimés comme *Slouch* (*Slou/S59*), *Apterous* (*Ap*), *Nautilus* (*Nau*) ou *Krüppel* (*Kr*) (Bourgouin *et al.*, 1992; Ruiz-Gomez *et al.*, 1997; Jagla *et al.*, 1998; Crozatier and Vincent, 1999; Knirr *et al.*, 1999; Su *et al.*, 1999; Balagopalan *et al.*, 2001) (Figure 33). Au final, l'identité de chaque muscle reflète l'expression par chaque FC d'une combinatoire spécifique de facteurs d'identité.

3.3.3. Facteurs d'identité musculaire : conservation de séquences pour des rôles différents

Alors que les gènes d'identité sont spécifiques à quelques types de fibre chez la Drosophile, leurs orthologues chez les vertébrés interviennent plus précocément dans les étapes de la myogénèse et de manière plus générale. Par exemple, *Lbx1*, l'orthologue du facteur d'identité *ladybird* (*Lb*) chez la Drosophile, intervient dans la migration des précurseurs musculaires des vertébrés. *Msx1*, l'orthologue de *msh*, intervient dans la prolifération des myoblastes. Et enfin *Myf5*, *MyoD* et *myogénine* qui interviennent dans la détermination et la différenciation des myocytes vertébrés ont pour orthologue avéré ou potentiel le facteur d'identité *nautilus* (*Nau*).

D'un point de vue fonctionnel, l'action des MRFs est plutôt semblable à celle du facteur *Tw*. Tout d'abord, ils sont tous deux capables de « produire » du muscle. L'apport de *MyoD* *in vitro* permet de convertir un grand nombre de types cellulaires en myoblastes (Weintraub *et al.*, 1991). Ce rôle instructif rappelle la fonction de *Tw* dont l'expression dans l'ectoderme suffit à induire la formation de fibres musculaires ectopiques (Castanon *et al.*, 2001). Par ailleurs, *Notch* est un régulateur négatif de *Tw* lors de la subdivision du mésoderme et est également capable d'inhiber *MyoD* (Hirsinger *et al.*, 2001; Tapanes-Castillo and Baylies, 2004). A l'opposé, *Wg* active l'expression de *twi* et régule positivement *MyoD* (Tajbakhsh *et al.*, 1998; Lee and Frasch, 2000).

3.4. Etapes terminales : quelques divergences initiales mais une très bonne conservation finale de la fonction musculaire

La formation des fibres musculaires embryonnaires/larvaires fonctionnelles nécessite comme chez les vertébrés la fusion des myoblastes, la myofibrillogénèse, l'attachement des myotubes à l'épiderme et leur innervation par des motoneurones.

3.4.1. La fusion des myoblastes

La fibre musculaire multinucléée larvaire est produite par fusion des myoblastes et sa taille est notamment déterminée par le nombre d'événements de fusion (Bate, 1990). Le processus de fusion se fait suivant les mêmes grandes étapes que chez les vertébrés : migration des cellules qui vont fusionner l'une vers l'autre, reconnaissance, adhésion, remodelage du cytosquelette et fusion à proprement parler. De nombreux gènes impliqués dans ce processus sont d'ailleurs conservés. Cependant, cette étape a deux particularités chez la Drosophile par rapport à la fusion vertébrée :

- (i) La fusion est asymétrique : elle a lieu entre une cellule fondatrice (FC) et plusieurs myoblastes compétents à la fusion (FCM) (Bate, 1990). Après fusion avec la FC ou le myotube en formation, le noyau du FCM nouvellement

incorporé perd l'expression de *lmd* et adopte le programme transcriptionnel de la FC (Beckett and Baylies, 2006).

- (ii) La fusion a lieu en deux temps : une première vague de fusion se produit au cours des stades embryonnaires 12 et 13 entre une FC et deux à trois FCM et donne naissance à un précurseur musculaire. Puis une seconde vague de fusion prend place aux stades 14 et 15 entre un précurseur musculaire et quelques FCM afin de former un myotube (Beckett and Baylies, 2007).

- *Migration*

Les FCMs forment des filopodes en direction des FCs ou myotubes en formation avec lesquels ils vont fusionner (Richardson *et al.*, 2007; Gildor *et al.*, 2009). Leur migration est dirigée par l'expression de *dumbfounded (duf)* et *roughest (rst)* au niveau des FCs et met en jeu des réarrangements du cytosquelette d'actine (Ruiz-Gomez *et al.*, 2000; Strunkelberg *et al.*, 2001; Gildor *et al.*, 2009). Aucune des protéines vertébrées impliquées dans la migration des myoblastes ne possède d'orthologue chez la Drosophile qui interviendrait à cette étape (Abmayr and Pavlath, 2012). Seul le processus est conservé.

- *Reconnaissance et adhésion FC/FCM*

Les FCs expriment spécifiquement la protéine Duf (Kirre) et les FCMs la protéine Stick-and-Stones (Sns) (Bour *et al.*, 2000; Ruiz-Gomez *et al.*, 2000). En plus de leur implication dans la migration des FCM, ces protéines membranaires, qui possèdent des domaines immunoglobulines interagissent pour permettre la reconnaissance et l'adhésion des myoblastes. Deux autres protéines membranaires à domaines immunoglobulines sont impliquées dans cette reconnaissance : Rst (Irre) majoritairement exprimée dans les FCs et Hibris (Hbs), un paralogue de Sns exprimé dans les FCMs (Artero *et al.*, 2001; Strunkelberg *et al.*, 2001) (Figure 34). Cependant, les mutants *hbs* ne présentent pas de défaut de fusion et Hbs ne sauve que très peu d'évènements de fusion dans les mutants *sns* (Shelton *et al.*, 2009). Duf et Sns sont les orthologues respectifs de Kirrel et Nephrin tous deux impliqués dans la reconnaissance des myoblastes du poisson-zèbre et de la souris (Srinivas *et al.*, 2007; Sohn *et al.*, 2009). De manière intéressante, il a été montré chez la souris que Nephrin est impliqué dans la fusion de manière asymétrique. L'expression de Nephrin serait en effet requise dans les myoblastes mais pas dans les myotubes, rappelant le rôle de Sns chez la Drosophile (Sohn *et al.*, 2009).

- *Remodelage du cytosquelette et fusion*

Au niveau du point de contact nouvellement établi, il se forme un focus d'actine F de manière prédominante dans le FCM et sous forme de fin feuillet dans le FC (Kesper *et al.*, 2007; Sens *et al.*, 2010). La formation du focus est déclenchée par les molécules d'adhésion mais la polymérisation de l'actine dépend du complexe Arp2/3 (Actin Regulatory Protein 2/3)

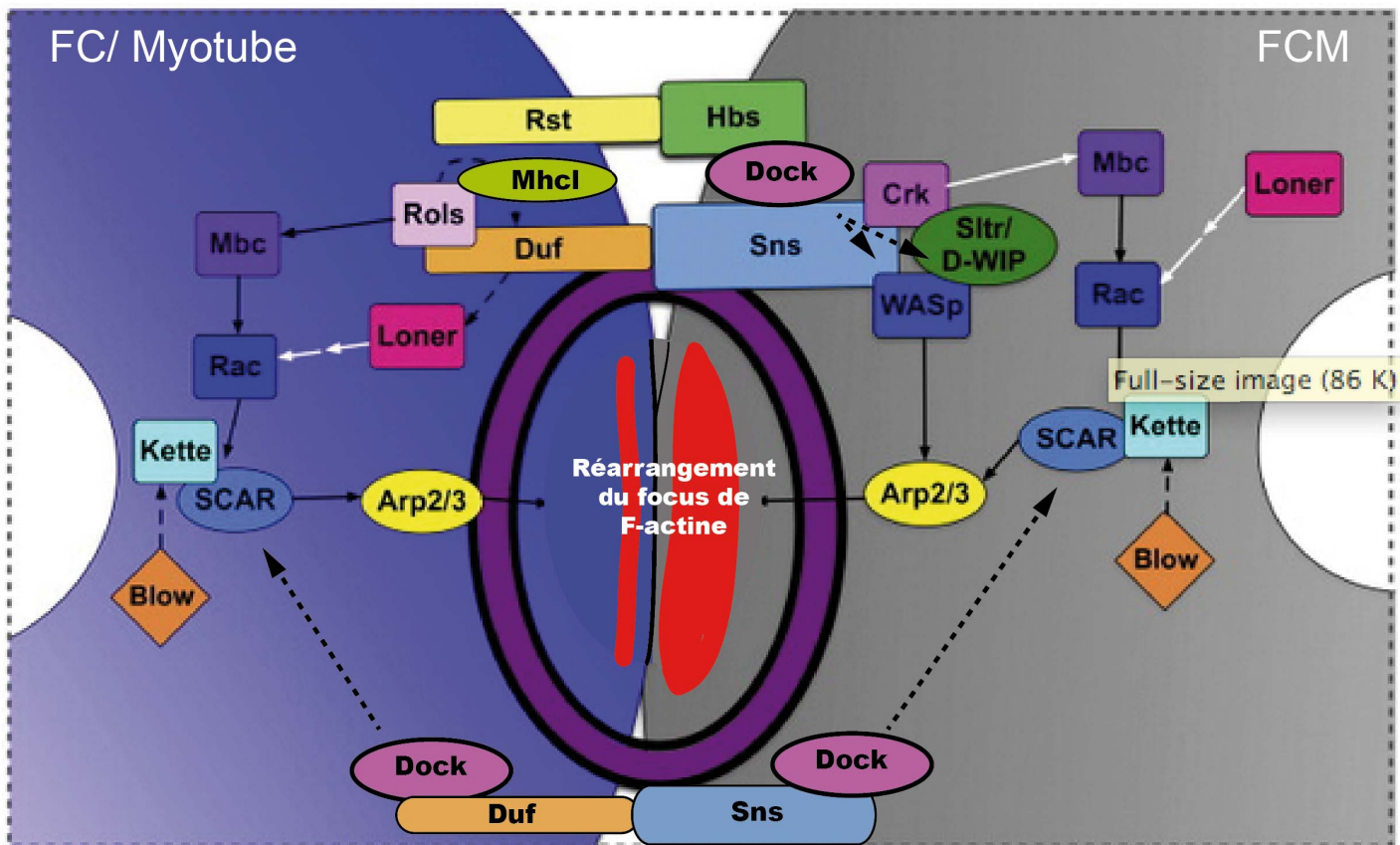


Figure 34. Rôle des différentes protéines dans la fusion

Seule les protéines Blow ne sont pas conservées chez les vertébrés. Les protéines représentées dans un rectangle ont un rôle décrit dans la fusion chez les vertébrés alors que la contribution à la fusion des orthologues des protéines représentées dans une ellipse n'a pas été décrite.

Adapté d'après Rochlin *et al.*, 2009

(Richardson *et al.*, 2007). Par ailleurs, se mettent en place des complexes protéiques appelés FuRMAS (Fusion Restricted Myogenic Adhesive Structure) qui permettent de restreindre le cœur d'actine à la zone de contact (Kesper *et al.*, 2007; Richardson *et al.*, 2007). Un certain nombre de protéines faisant le lien entre les protéines transmembranaires d'adhésion et Arp2/3 sont connues et bien conservées avec les vertébrés pour la plupart (Figure 34).

Dans les FCs, la protéine Rolling pebbles/Antisocial (Rols/Ants) est présente et interagit avec Duf, avec la protéine Myoblast City (Mbc) et comme il a été montré tout récemment avec Mhcl (Myosin heavy chain-like) (Chen and Olson, 2001; Bonn *et al.*, 2012). Mbc possède une activité GEF (Guanine-nucleotide Exchange Factor) qui permet d'activer Rac1 et Rac2, des GTPases de la famille Rho (Erickson *et al.*, 1997; Hall, 1998; Nolan *et al.*, 1998). Une fois activées, ces GTPases activent à leur tour SCAR en régulant le complexe multi-protéique Kette/Sra-1-CYFIO-Pir121/HSPC300 (Richardson *et al.*, 2007). SCAR active enfin le complexe Arp2/3 (Richardson *et al.*, 2007). La protéine Loner/Schizo présente uniquement dans les FCs et dont la localisation est dépendante de Duf, permet également la fusion des myoblastes en régulant la voie Rac (Chen *et al.*, 2003). Il a été montré récemment que Dreadlocks (Dock) interagit physiquement avec Duf et permet probablement lui aussi l'activation de SCAR (Kaipa *et al.*, 2013).

Dans les FCMs, trois voies permettent l'activation de Arp2/3. Deux d'entre elles sont similaires, bien qu'avec des variantes, à celles décrites dans les FCs et passent par Mbc (Haralalka *et al.*, 2011) ou Dock (Kaipa *et al.*, 2013) pour activer SCAR. Dans le cas de Mbc, son activation est permise par Crk, un interacteur physique de Sns spécifique des FCMs. Quant à Dock, il interagit physiquement avec Sns et Hbs. La troisième voie fait intervenir un second activateur du complexe Arp2/3, WASp (Massarwa *et al.*, 2007). WASp est lui-même activé par Crk qui interagit à la fois avec Sns et Wip (WASp interacting protein), son propre partenaire (Berger *et al.*, 2008). Une dernière alternative récemment suggérée est que Dock puisse activer WASp et Wip (Kaipa *et al.*, 2013) pour permettre la fusion.

- **Régulation de la fusion muscle-spécifique**

L'ensemble des gènes décrits ci-dessus est nécessaire pour l'ensemble des muscles larvaires. Cependant, chaque muscle possède un nombre de noyaux qui lui est propre. Des travaux menés au laboratoire ont montré que les gènes d'identité déterminent spécifiquement le nombre d'événements de fusion dans un muscle donné en régulant différemment l'expression de plusieurs gènes codant des protéines du cytosquelette (Bataille *et al.*, 2010). Il s'agit des gènes *Muscle protein 20 (Mp20)*, *Paxillin (Pax)* et *m-spondin (mspo)*, cibles des gènes d'identité *eve*, *slouch (slou/S59)* et *ladybird (lb)*.

3.4.2. Attachement des myotubes à l'épiderme et innervation

Afin de résister aux forces de contractions et ainsi permettre la locomotion de la larve, les muscles embryonnaires de la Drosophile doivent trouver des points d'ancrage auxquels

s'attacher. La Drosophile ne disposant ni d'os ni de cartilage, l'attachement des muscles se fait en parallèle à la formation des myotubes par fusion au niveau des cellules tendon de l'exosquelette (Volk, 1999). Ce mécanisme ne sera pas développé dans cette partie. De même pour l'innervation des fibres musculaires par les motoneurones que je ne décrirai pas. Je souhaite simplement mentionner ici à titre d'information que cette étape conduit à la formation de 36 motoneurones innervant les 30 muscles larvaires de chaque hémisegment (Landgraf and Thor, 2006).

3.4.3. Formation de l'appareil contractile et contraction musculaire

- *Formation des sarcomères*

Chez la Drosophile, les sarcomères sont également délimités par les lignes Z, formés de filaments fins constitués d'actine et de complexes troponine-tropomyosine qui s'associent aux lignes Z par l'intermédiaire de protéines d' α -actinine et de filaments épais de myosine qui s'associent au niveau des lignes M. Etant donnée la très forte conservation entre les espèces de la structure des sarcomères, on peut émettre l'hypothèse d'une grande conservation du processus.

La myofibrillogénèse est intensivement étudiée dans les cellules cardiaques en culture ou pendant la formation des muscles de vol de la Drosophile. Bien que très peu d'éléments soient connus sur l'assemblage des myofibrilles dans le muscle embryonnaire de Drosophile, une récente observation *in vivo* de la protéine endogène Zasp52 fusionnée à la GFP dans les muscles embryonnaires et adultes, soutient chez la Drosophile le modèle de pré-myofibrilles exposé dans la partie III.2.4.3 (Katzemich *et al.*, 2013).

- *Contraction musculaire*

Le processus de contraction musculaire étant connu dans le détail chez les vertébrés et très bien conservé entre les espèces, il n'est pas étudié chez la Drosophile. Comme mentionné précédemment, la structure sarcomérique est très bien conservée ainsi que les canaux mis en jeu dans la polarisation / dépolarisation des membranes et la gestion des flux calciques.

La DM1 affecte prioritairement les muscles squelettiques distaux lors des étapes tardives de la myogenèse (fusion des myoblastes et fonction musculaire). De façon intéressante, ce sont ces étapes qui sont les mieux conservées entre Drosophile et vertébrés, motivant l'utilisation de modèles de Drosophile pour l'étude des atteintes musculaires dans cette pathologie.

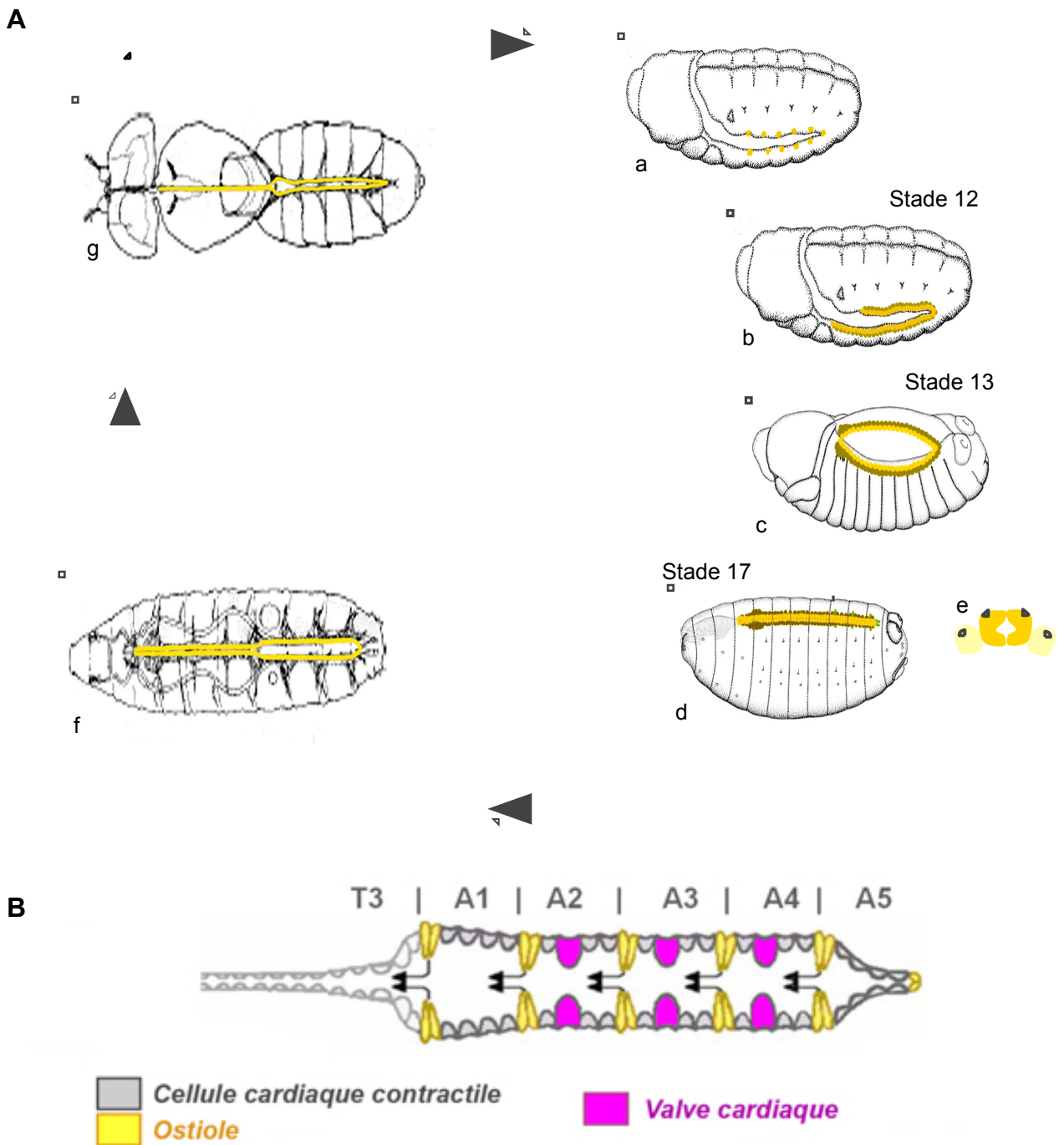


Figure 35. Développement du muscle cardiaque chez la Drosophile

A) Au stade 11, le mésoderme cardiaque est déterminé (a). Au stade 12, les cardioblastes nouvellement spécifiés s'alignent sur un rang de part et d'autre de l'embryon puis chacune des rangées migre dorsalement conjointement au mouvement de l'ectoderme subjacent (b,c). Après la fermeture dorsale au stade 17 (d), les rangées de cardioblastes se joignent et fusionnent. La lumière entre les deux rangées de cardioblastes (e) permet la circulation de l'hémolymphe. Au stade larvaire (f), la lumière du cœur dans la partie postérieure du tube cardiaque est plus importante que celle de l'aorte dans la partie antérieure. Un remodelage du tube cardiaque au cours de la vie pupale aboutit au cœur adulte localisé dans l'abdomen de la mouche et à l'aorte dans le thorax (g). B) La structure du cœur adulte dépend de trois types cellulaires : les cardioblastes (gris) qui possèdent une activité contractile, les ostioles (jaune) qui sont les points d'entrée de l'hémolymphe et les valves cardiaques (rose) qui orientent l'hémolymphe au sein de la cavité cardiaque.

D'après *Atlas of Drosophila Development* par Volker Hartenstein

IV. La fonction cardiaque au cœur de la DM1 : conservation des mécanismes de cardiogénèse entre *Drosophile* et vertébrés

Le cœur joue un rôle vital chez les vertébrés et est de ce fait le premier organe mis en place lors de l'embryogenèse. Sa structure complexe et organisée ne peut souffrir la moindre altération car peut engendrer des dysfonctionnements pouvant conduire jusqu'à la mort comme c'est le cas dans la DM1. Nous verrons dans ce chapitre que la structure cardiaque de la *Drosophile* bien qu'élémentaire est conservée avec celle des vertébrés. Néanmoins, n'étant pas vitale, elle permet d'approfondir l'étude de certains aspects de la maladie. Puis, je dresserai une vue d'ensemble des troubles cardiaques développés par les patients DM1.

2.1. Mise en place du cœur chez *Drosophila melanogaster*

La *Drosophile* est le modèle génétique le plus simple qui soit possédant un organe de type pompe cardiaque. Ce cœur formé de peu de cellules peut permettre de conduire des analyses avec une résolution d'une cellule.

2.1.1. Généralités

Le tube cardiaque (ou vaisseau dorsal) de la *Drosophile* mis en place au cours de l'embryogenèse est une structure tubulaire contractile, positionnée dorsalement le long de la ligne médiane et rattachée à la cuticule par les muscles alaires.

La morphologie du cœur au cours des différents stades développementaux de la *Drosophile* est présentée dans la Figure 35A. Une fois formé, le tube cardiaque est constitué d'une monocouche de cellules épithéliales contractiles (les cardioblastes) flanquée de part et d'autre d'une rangée de cellules péricardiaques (PC) qui ont un rôle de support structural et une fonction endocrine. Quelques PC antérieures se différencient ultérieurement en cellules lymphatiques pour former la glande lymphatique.

Les cardioblastes, les PC et la glande lymphatique sont dérivés du mésoderme cardiaque (voir chapitre III.3.2.2). La partie postérieure du tube (segments A5-A7) est dilatée et forme le cœur à proprement parlé où l'hémolymphe entre par des cellules spécialisées, les ostioles, lors de la dilatation (diastole). La contraction (systole) ferme ces ostioles et éjecte l'hémolymphe vers la partie antérieure de la larve ou l'adulte via l'aorte (Figure 35B).

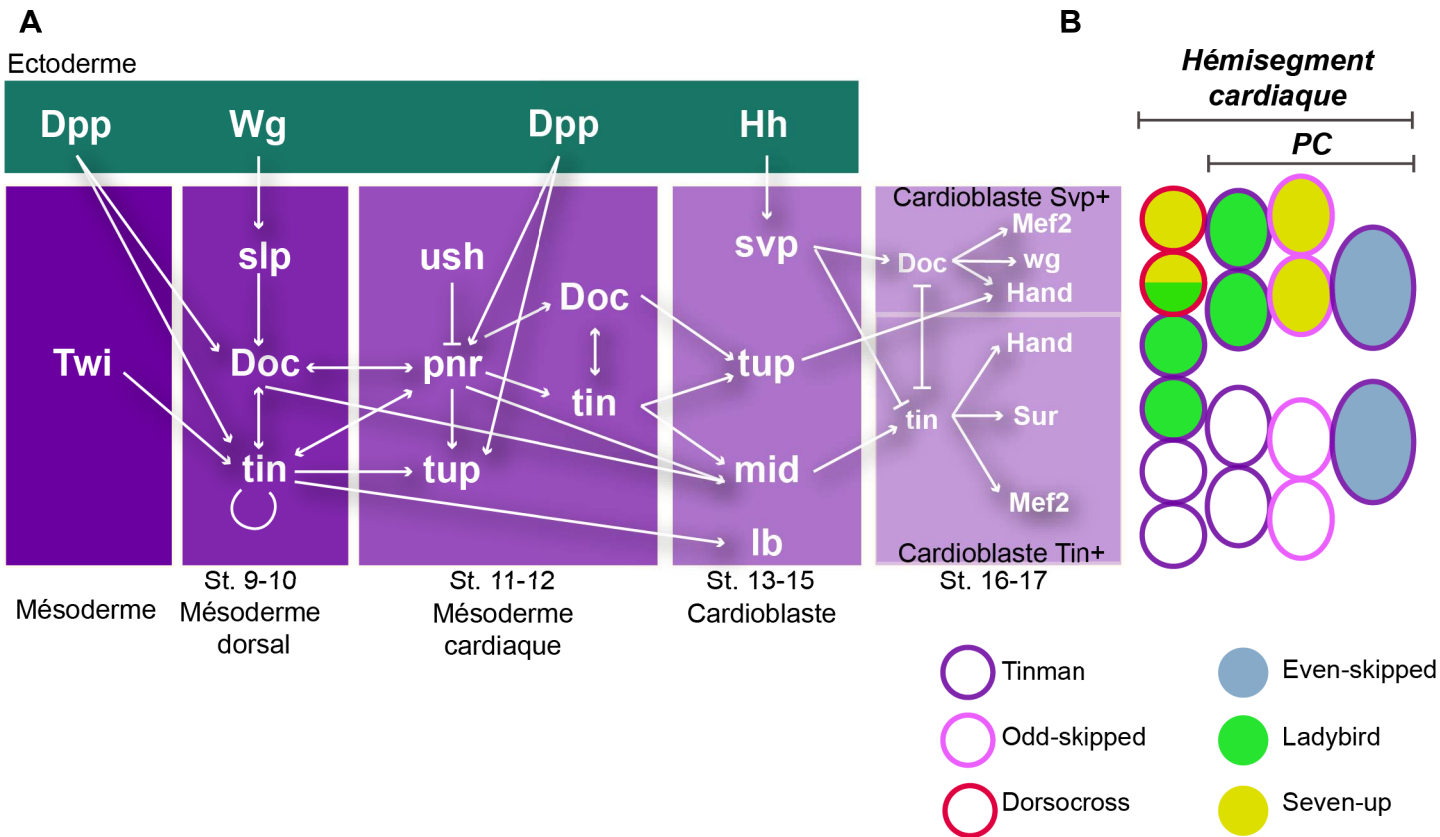


Figure 36. Réseau génique contrôlant la diversification des cardioblastes

A) Réseau des gènes cardiaques contrôlant le développement du cœur embryonnaire d'après les données issues de la littérature. B) Représentation schématique d'un hémisegment cardiaque contenant 6 cardioblastes et 10 cellules péricardiaques (PC). Ces cellules sont définies par la combinaison des facteurs de transcription qu'elles expriment.

2.1.2. Diversification des cellules cardiaques et péricardiaques

Plusieurs types cellulaires reconnaissables par leur morphologie, leur propriété de différenciation et l'expression de gènes peuvent être distingués dans le cœur. L'observation des phénotypes cardiaques d'embryons mutants pour les facteurs de transcription cardiaques ou les composants des voies de signalisation a permis d'établir un modèle de réseau génique contrôlant la diversification cardiaque (Figure 36A).

Comme décrit ultérieurement, l'action combinée des signaux ectodermiques Dpp et Wg permet au mésoderme dorsal de se spécifier en champs cardiaque. En effet, Dpp permet le maintien de l'expression de Tin dans tout le champs alors que l'intersection de l'expression de Dpp et Wg active le gène T-box *Doc* (*Dorsocross*) de manière segmentée (Wu *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1996). Tin et Doc sont ensuite requis pour activer l'expression du facteur de transcription *pnr* (*pannier*) (Gajewski *et al.*, 2001; Reim and Frasch, 2005). Au stade 11, *pnr* maintient à son tour l'expression de *tin* et Doc, ces trois facteurs devenant ainsi interdépendants définissent le mésoderme cardiaque. Au stade 12, les cardioblastes nouvellement spécifiés s'alignent sur un rang de chaque côté de l'embryon. Afin de former un tube fonctionnel, les deux rangées de cellules cardiaques et péricardiaques vont migrer dorsalement pour se rapprocher, de manière conjointe à l'épiderme subjacent au cours de la fermeture dorsale (Zaffran *et al.*, 1995). Il est établi que c'est la sécrétion de la pericardine par les PC qui permet d'ancrer les cardioblastes à l'épiderme (Chartier *et al.*, 2002). Au stade 17, les cardioblastes fusionnent pour former le tube cardiaque (Figure 35Ad).

Dès le stade 13 embryonnaire, tous les progéniteurs ont terminé leur division et le nombre de cellules du cœur embryonnaire et larvaire est définitif. On dénombre 54 cardioblastes et 90 PC réparties sur 2 segments thoraciques et 7 abdominaux. L'organisation de ces cellules est très stéréotypée et arrangée en motifs reproductibles d'un héli-segment à l'autre (Figure 36B).

Chaque héli-segment compte 6 cardioblastes qui expriment le facteur de transcription *Mef2* (*myocyte enhancer factor 2*) (Gajewski *et al.*, 1997) comme toutes les cellules musculaires ainsi que le facteur GATA *pnr* (*pannier*) qui répriment les PC (Gajewski *et al.*, 1999). Les deux cardioblastes les plus antérieurs expriment le gène *svp* (*seven-up*), récepteur orphelin aux hormones stéroïdes (Gajewski *et al.*, 2000) qui va finir par réprimer l'expression de *tin* (Lo and Frasch, 2001). Ces cardioblastes *svp* positifs forment les ostioles dans les segments A5-A7 du cœur embryonnaire puis A1-A4 du cœur adulte (Molina and Cripps, 2001; Ponzielli *et al.*, 2002) (Figure 37C). Les quatre autres cardioblastes les plus postérieurs continuent d'exprimer *tin* leur permettant d'adopter une destinée de cellules contractiles. Parmi eux, les deux plus antérieurs co-expriment le facteur de transcription *lb* (Jagla *et al.*, 1997).

Les PC sont au nombre de 10 par héli-segment. Contrairement aux cellules cardiaques, les PC ne sont pas contractiles. Elles expriment toutes le facteur de transcription

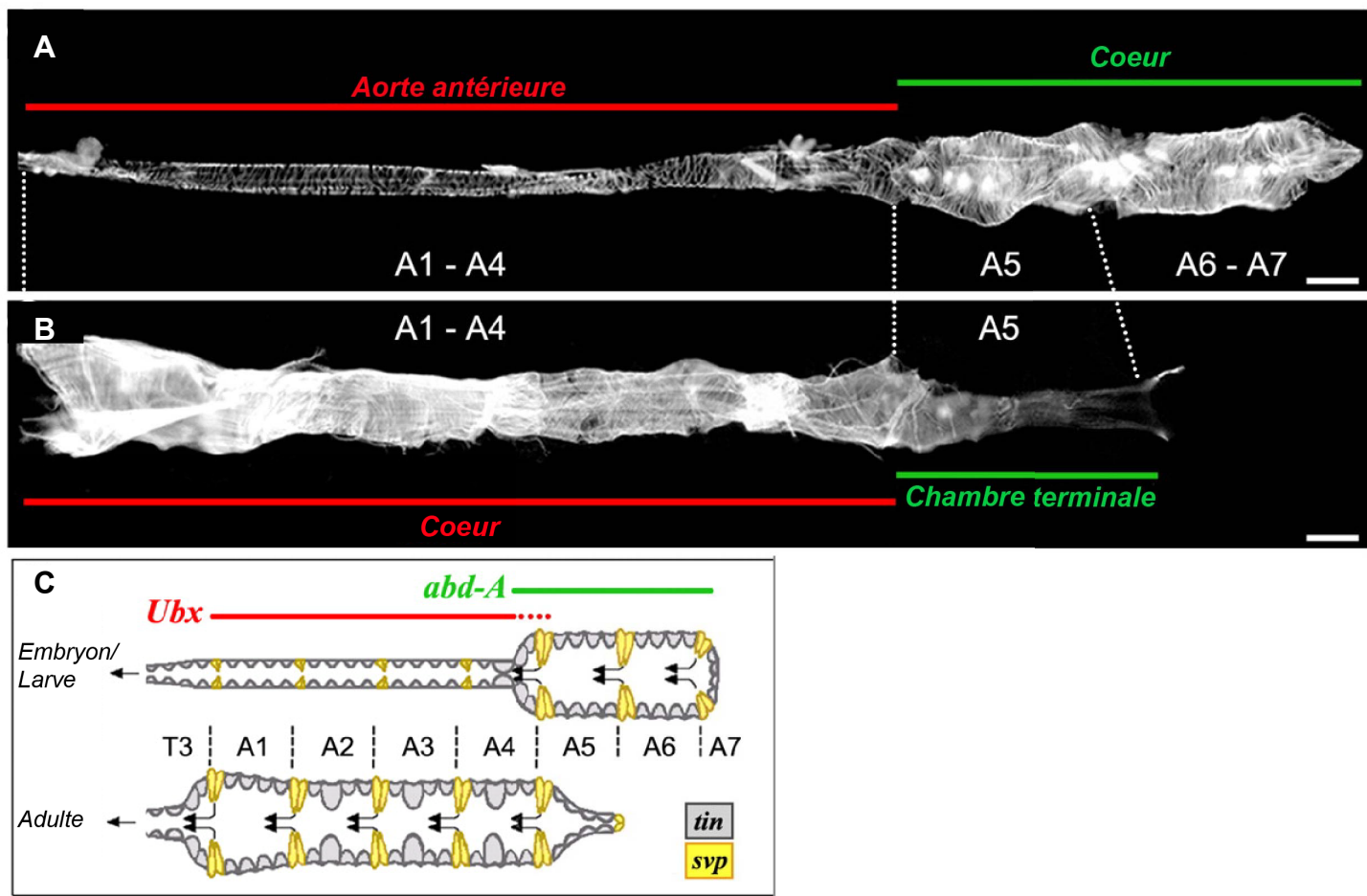


Figure 37. Remodelage du tube cardiaque lors de la métamorphose de la Drosophile

Tube cardiaque larvaire (A) et adulte (B) visualisés avec la phalloïdine. C) Schéma des cœurs larvaire (haut) et adulte (bas). Les profils d'expression de *svp*, *tin*, *Ubx* et *abdA* sont indiqués.

Zfh-1 (Lai *et al.*, 1991), dont la présence dans les cellules non musculaires est en accord avec son action répressive sur *mef2* (Postigo *et al.*, 1999). (Figure 36B). Zfh-1 est indispensable au maintien de l'expression des gènes qui spécifient les différents sous populations de PC (Su *et al.*, 1999). Six PC sont *tin*-positives. Parmi celles-ci 2 co-expriment *eve* alors que 2 autres co-expriment *lb* (Frasch *et al.*, 1987; Jagla *et al.*, 1997). *lb* et *eve* se répriment l'un l'autre permettant ainsi de maintenir une expression exclusive de ces facteurs dans ces groupes de cellules (Jagla *et al.*, 2002). Enfin, les quatre PC qui n'expriment pas *tin* expriment *odd* (*odd-skipped*) et parmi cette sous-population, les 2 plus antérieures co-expriment *svp* (Ward and Skeath, 2000).

2.1.3. Diversification antéro-postérieure du tube cardiaque

Comme décrit précédemment, le tube cardiaque est divisé en deux régions : le cœur dans la région la plus postérieure et l'aorte dans sa région la plus antérieure. Le modelage antéro-postérieur du vaisseau dorsal est contrôlé par l'expression de gènes sélecteurs homéotiques du complexe Antennapedia et Bithorax. Des expériences de gain et perte de fonctions de *abdominal-A* ont montré que l'expression de *abdominal-A* est nécessaire et suffisante à la spécification du cœur (Lo *et al.*, 2002; Lovato *et al.*, 2002; Ponzielli *et al.*, 2002). De même, il a été montré que la spécification de l'aorte contenant les cellules Svp positives dépend de l'action de Ultrabithorax (Perrin *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2005). De la même manière, le choix entre une destinée de cellule péricardique ou de glande lymphatique est régulé en partie par l'activité de Ultrabithorax (Rodriguez *et al.*, 1996).

2.1.4. Remodelage du cœur adulte au cours de la métamorphose

Lors de la métamorphose, deux modifications morphologiques notables du tube cardiaque se produisent (Figure 37) :

(i) Le cœur de la larve en position A5-A7 est histolysé et un cœur adulte se forme à partir de l'aorte larvaire dans les segments A1-A5. Ainsi, les ostioles larvaires sont détruites et de nouvelles se développent à partir des cellules Svp positives de l'ancienne aorte de la larve (Molina and Cripps, 2001).

(ii) Un réseau de fibres longitudinales se forme ventralement par-dessus le réseau de fibres circulaires déjà existantes chez la larve. Ces fibres multinucléées trouvent leur origine dans un groupe de cellules Mef2 positives postérieures des cellules de la glande lymphatique (Shah *et al.*, 2011).

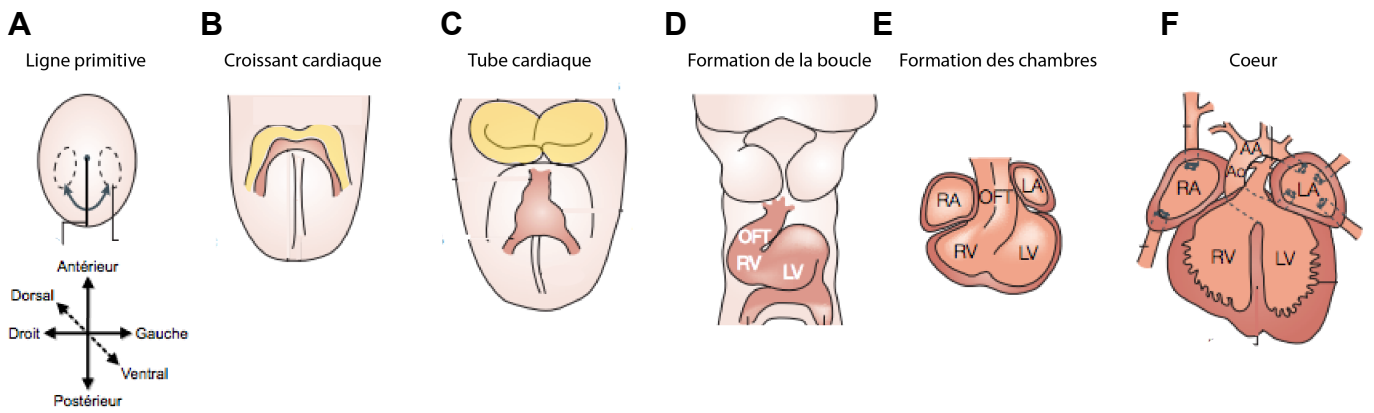


Figure 38. Morphogénèse du cœur de souris

A) Les cellules progénitrices sont issues de la ligne primitive d'où elles migrent antérieurement. B) Ces cellules se positionnent sous le pli céphalique (en jaune) pour constituer le croissant cardiaque où des cardiomyocytes sont déjà différenciés. C) Le tube cardiaque se forme par fusion du croissant cardiaque au niveau de la ligne médiane. D) Le tube forme une boucle sur la droite. E) Le cœur possède désormais 4 chambres mais c'est toujours un tube. F) La septation des chambres cardiaques engendre les cavités droite et gauche à partir d'une oreillette primitive, d'un ventricule primitif et de la voie efférente. LV : ventricule gauche ; RV : ventricule droit ; OFT : voie efferente ; LA : oreillette gauche ; RA : oreillette droite ; Ao : aorte.

Buckingham *et al.*, 2005

2.2. Cardiogenèse des vertébrés par comparaison à celle de la *Drosophile*

2.2.1. Vue d'ensemble du développement cardiaque vertébré

On peut décomposer la morphogénèse cardiaque des vertébrés en quatre étapes : (i) détermination et spécification des cardiomyocytes, (ii) formation du tube cardiaque, (iii) formation d'une boucle, développement des chambres et croissance et enfin (iv) formation des coussins endocardiques, des valves et du septum (Figure 38).

Les progéniteurs cardiaques font partie des premières cellules mésodermiques à gastruler au niveau de la ligne primitive (Garcia-Martinez and Schoenwolf, 1993; Schoenwolf and Garcia-Martinez, 1995; Icardo, 1996). Juste après la gastrulation, l'endoderme antéro-latéral et le mésoderme antéro-central induisent la différenciation en cardiomyocytes des cellules de la ligne primitive postérieure (Schultheiss *et al.*, 1995). Ces cellules migrent ensuite de manière antéro-latérale pour former le premier champ cardiaque dont les cellules expriment spécifiquement les marqueurs cardiaques comme Nkx-2.5, GATA4, MEF-2 et Tbx5 (Schultheiss *et al.*, 1995; Lyons, 1996; Fishman and Chien, 1997; Searcy *et al.*, 1998; Kostetskii *et al.*, 1999).

Suite à leur spécification, les cellules cardiaques convergent le long de la ligne médiane pour fusionner et ainsi former un tube cardiaque. Le tube cardiaque croît par une addition graduelle de cellules provenant du mésoderme splanchnique dorsal qui entoure le tube cardiaque et communément appelé champ cardiaque secondaire. À ce jour, aucun marqueur cellulaire permettant de distinguer les myocytes provenant du premier ou du second champ cardiaque n'est connu.

Alors que la fusion n'est pas encore terminée, le tube cardiaque composé du myocarde et de l'endothélium, séparés de la gelée cardiaque¹ forme une boucle vers la droite pour permettre la création de quatre chambres.

La gelée cardiaque finit par disparaître sauf au niveau des zones de jonction où elle sera envahie par des cellules de l'endothélium ayant subi une transition épithélio-mésenchymateuse pour former les coussins (ou bourgeons) endocardiques. Ces coussins, rapprochés par la formation de la boucle, permettent la formation des valves et des septa qui cloisonnent les oreillettes et les ventricules et permettent également la séparation de l'aorte et de l'artère pulmonaire (Eisenberg and Markwald, 1995).

¹ Couche acellulaire sécrétée par le myocarde en voie de développement qui semble produire un effet démultiplicateur de la contraction des premières cellules myocardiques.

2.2.2. Conservation de la structure cardiaque

La première divergence entre les structures cardiaques des vertébrés et de la *Drosophile* est la position ventrale du cœur chez les vertébrés et la position dorsale du tube cardiaque de la mouche. Cette première opposition n'est en réalité que le reflet de l'inversion du corps des insectes par rapport à celui des vertébrés (Bodmer, 1995). La seconde différence notable entre le cœur mammifère et le cœur de *Drosophile* est que le premier s'inscrit dans un système circulatoire fermé alors que le second appartient à un système circulatoire ouvert. Cependant dans les deux cas, le but ultime est la distribution d'un fluide biologique contenant des nutriments aux autres organes/tissus : le sang pour les vertébrés qui apporte également de l'oxygène, l'hémolymphe pour la *Drosophile*. Contrairement aux vertébrés, le cœur n'est pas indispensable à la survie de la *Drosophile* car la circulation de l'oxygène se fait par les trachées et non par l'hémolymphe. De fait, l'analyse de gènes essentiels au développement et à la fonction cardiaques par invalidation de gènes peut aisément être réalisée sur cette espèce.

De la même manière que chez la *Drosophile*, les cellules cardiaques des vertébrés ont une origine mésodermique et migrent latéro-ventralement pour converger en un croissant cardiaque et finalement fusionner au niveau de la ligne médiane pour former le tube cardiaque primitif. Le tube cardiaque de la *Drosophile* ressemble au cœur vertébré primitif avant la formation de la boucle qui permet de générer les quatre chambres. Dans le cas des mammifères, la compartimentation du cœur en quatre chambres permet de varier la pression sanguine sans variation de volume. Le cœur à proprement parler de la *Drosophile* adulte, bien que proche du tube cardiaque primitif mammifère, est également compartimenté mais de manière linéaire en quatre chambres par trois paires de cellules appelées « valves ». Il est communément admis que ces valves dirigent la circulation de l'hémolymphe du postérieur vers l'antérieur mais leur rôle dans la régulation de la pression n'a jamais été démontré (Zeitouni *et al.*, 2007).

Les cardiomyocytes de la *Drosophile* possèdent plusieurs caractéristiques des cellules cardiaques vertébrées : les cellules sont mononucléées et striées et leur membrane plasmique forme par endroit des invaginations profondes réminiscentes des tubules T (Protasi *et al.*, 1996; Lehmacher *et al.*, 2012). Cependant, dans le cas de l'embryon de *Drosophile*, le tube cardiaque est formé d'une monocouche de cellules contractiles en contact direct avec l'environnement intérieur et extérieur du tube. Ainsi, une seule cellule doit assurer les trois fonctions permises dans le cas du cœur de mammifère par trois types cellulaires : l'endocarde (à l'intérieur), le myocarde qui possède l'activité contractile et l'épicarde (en contact avec l'environnement extérieur).

Table 8. Tableau récapitulatif des gènes impliqués dans le développement cardiaque conservés entre Drosophile et vertébrés

Références	Phénotypes des mutants perte de fonction	Gène de la Drosophile	Orthologues vertébrés	Phénotypes des mutants perte de fonction	Références
Gènes codant pour des molécules sécrétées					
Frasch 1995	Perte complète des cellules mésodermiques cardiaques et viscérales	<i>Dpp</i>	<i>BMP</i>	Mésoderme extra-embryonnaire réduit	Winnier 1995
Pozzielli 2002	Diminution de l'expression de svp, différenciation altérée des ostioles	<i>Hh</i>	<i>Shh</i>	Un seul OFT (pas d'artère pulmonaire) Communication interventriculaire	Washington Smoaka, 2005
Wu 1995 ; Lawrence 1995	Pas de formation des progéniteurs du tube cardiaque	<i>Wg</i>	<i>Wnt</i>	<i>Wnt5a</i> -/- <i>wnt1</i> -/- : Une seule chambre cardiaque Spécification des progéniteurs du deuxième champ cardiaque	Cohen 2012
Gènes codant des facteurs de transcription					
Reim 2005	Défaut sévère de spécification des cellules cardiaques (perte de nombreux marqueurs)	<i>Doc1/2/3</i>	<i>Tbx6, Tbx2/3/5</i>	<i>Tbx5</i> : Défaut sinoatrial, VG sous-développé	Takeushi 2003 ; Bruneau 2001
Han 2006	Structure discontinuée du TC. Une seule chambre au lieu de trois au stade larvaire.	<i>Hand</i>	<i>Hand1/2</i>	Pas de ventricule. Une seule oreillette	(Mc Fadden 2005 ; Small 2004)
Jaglia 1997 ; Zikova 2003	Diversification des cellules PC altérée Participe à la formation de OFT	<i>Lbe/Lbl</i>	<i>Lbx1/2/3</i>	<i>Lbx1</i> : Spécification d'une sous population cardiaque altérée Formation de la boucle altérée	Schäfer 2003
Gajewski 1999 ; Klindinst 2003	Majorité des progéniteurs cardiaques ne sont pas spécifiés et le TC ne se forme pas	<i>pnr</i>	<i>Gata4/5/6</i>	Hypoplasie du VD accompagnée d'une diminution de l'expression de <i>Hand2</i> Valve aortique bicuspidée	Zeisberg 2005 ; Laforest 2011
Bour 1995	Différenciation tardive du cœur affectée (pas d'expression de MHC mais cellules cardiaques bien présentes)	<i>Mef2</i>	<i>Mef2</i>	VD non développé (expression diminuée de <i>Hand2</i>) OFT réduit. IFT anormal	Lin 1997 Dodou 2004
Miskolczi-McCallum 2004	Pas de phénotypes cardiaques même pour le double mutant	<i>mid/H15</i>	<i>Tbx20</i>	Pas de chambres. Pas d'expression de <i>Hand1</i> . OFT perturbé	Takeushi 2005 ; Singh 2005 ; Stenard 2005
Zaffran 2006	Perte totale des dérivés du mésoderme dorsal (TC, muscles viscéraux, muscles somatiques dorsaux)	<i>tin</i>	<i>Nkx2.5</i>	Un seul compartiment auriculaire et ventriculaire..Pas d'expression de <i>Hand1</i>	Lyons 1995 ; Yamagishi 2001
Mann 2009 ; Zmojdzian 2013	Défaut de spécification des cellules cardiaques (expression diminuée de <i>Tin</i> , <i>Pnr</i> , <i>Doc3</i>) Défaut de formation de OFT	<i>tup</i>	<i>Isl1</i>	Un seul compartiment auriculaire et ventriculaire avec une identité de VG (<i>Hand1</i> , <i>Tbx5</i> exprimés) Pas d'OFT	Cai 2003

TC : tube cardiaque ; VG : ventricule gauche ; VD : ventricule droit ; PC : cellules péricardiaques ; OFT : Outflow tract (voie efférente) ; IFT : Inflow tract (voie afférente)

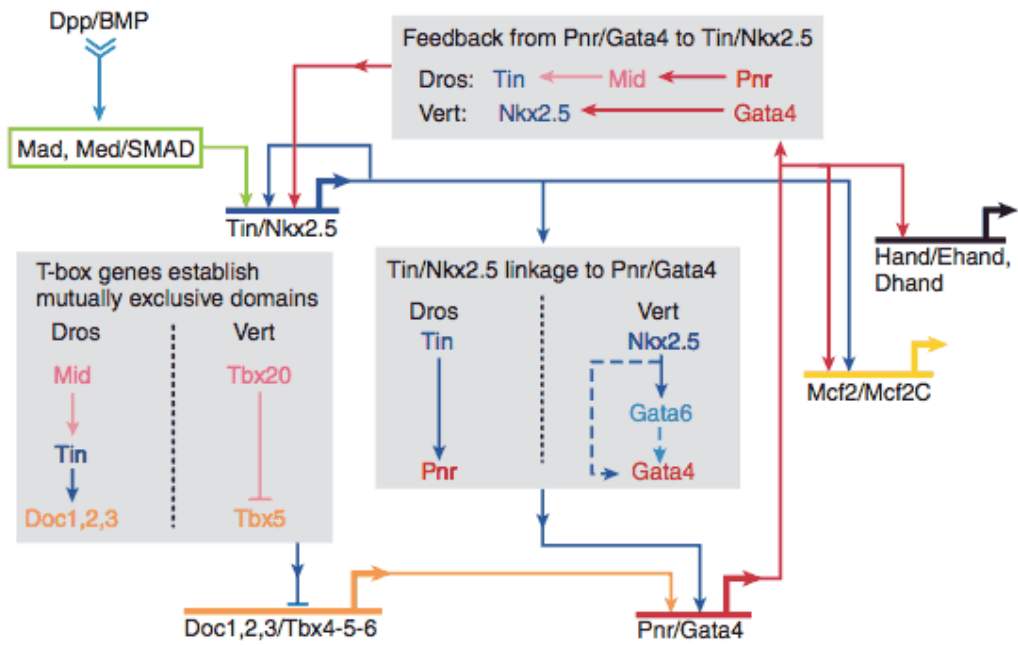


Figure 39. Conservation des facteurs de transcription et des voies de signalisation au sein du réseau génique contrôlant le développement cardiaque de la Drosophile et des vertébrés

<http://scienceblogs.com/pharyngula/2006/02/18/its-not-just-the-genes-its-the/>

2.2.3. Conservation des gènes et voies de signalisation du développement cardiaque

La spécification du mésoderme cardiaque dépend de signaux issus de la couche adjacente, ectoderme chez la mouche, endoderme chez les vertébrés. Bien que sécrétés par des couches différentes, ces signaux sont pourtant les mêmes : FGF (Barron *et al.*, 2000; Reifers *et al.*, 2000), Wnt (Marvin *et al.*, 2001; Schneider and Mercola, 2001; Tzahor and Lassar, 2001) et TGF β (Schultheiss *et al.*, 1997; Andree *et al.*, 1998; Ladd *et al.*, 1998).

Malgré les différences morphologiques, souvent, les facteurs impliqués dans le développement du cœur ont d'abord été identifiés chez la Drosophile avant que leur rôle ne soit démontré chez les vertébrés. La table 8 récapitule de manière comparative ces facteurs et la conséquence de leur invalidation chez la Drosophile ou les vertébrés. Plus important encore, l'organisation des voies de signalisation et des facteurs de transcription au sein des réseaux géniques contrôlant le développement cardiaque est similaire (Figure 39) (Cripps and Olson, 2002).

2.3. Troubles cardiaques des patients DM1

Les troubles cardiaques demeurent la seconde cause de mort prématurée des patients DM1 (20%) après la détresse respiratoire (43%) (de Die-Smulders *et al.*, 1998; Mathieu *et al.*, 1999; Lazarus *et al.*, 2002; Mladenovic *et al.*, 2006; Groh *et al.*, 2008). Les manifestations symptomatiques sont palpitations, syncope, insuffisance cardiaque et mort subite. Cependant, la plupart du temps, l'implication du cœur dans la DM1 est cliniquement asymptomatique. Aussi à ce jour, il n'y a pas de recommandation quant au début de prise en charge afin d'empêcher ou de réduire la mortalité prématurée des patients DM1 due à un dysfonctionnement cardiaque.

Plusieurs types de complications cardiaques ont été rapportés dans la littérature. Les plus fréquentes (anomalies de l'électrocardiogramme (ECG) et altération de la conduction cardiaque) sont bien reconnues de la communauté scientifique DM1. Il ne faut cependant pas négliger les complications plus rares. Afin de comprendre les dérégulations cardiaques chez les patients DM1, je vais tout d'abord présenter le système de conduction cardiaque et un électrocardiogramme de cœur sain.

2.3.1. Fonctionnement normal d'un cœur sain

L'électrocardiographie (ECG) est une représentation graphique de l'activité électrique du cœur. Elle comporte plusieurs ondes répétées, chaque onde dans un ordre bien défini par rapport à la suivante (Figure 40A). Tout d'abord, l'onde P correspond à la contraction des oreillettes droite et gauche (OD, OG). Puis, le complexe QRS qui lui succède correspond à la contraction des ventricules droit et gauche (VD, VG). La relaxation des oreillettes qui a lieu au

A

B

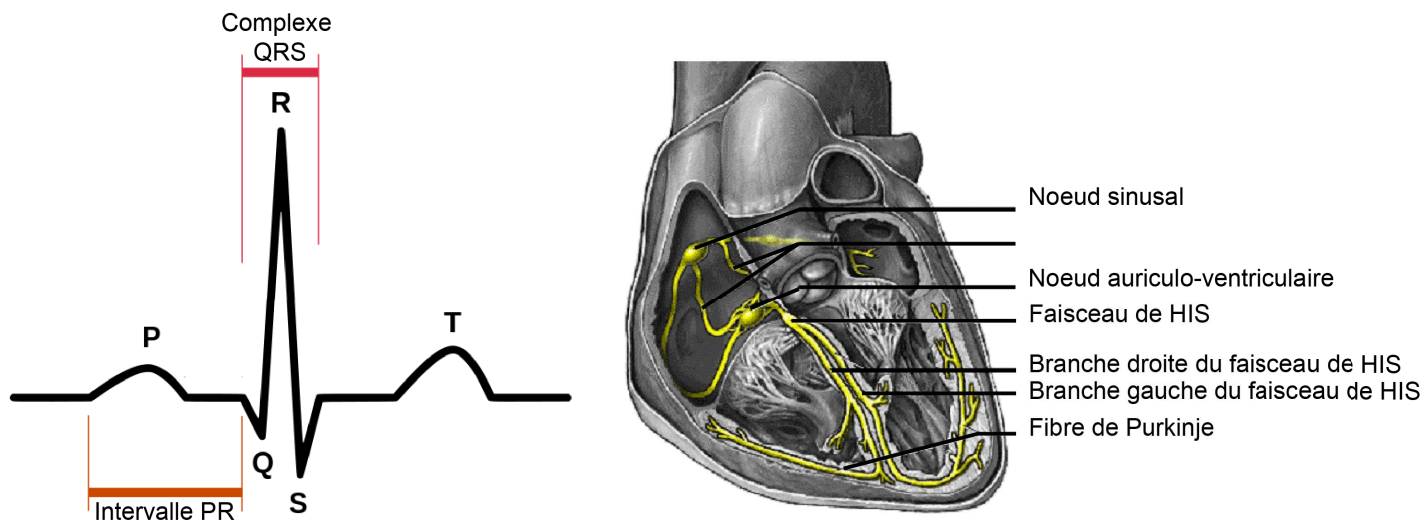


Figure 40. Activité électrique normale d'un cœur sain

A) Electrocardiogramme normal constitué d'une onde P correspondant à la dépolarisation des oreillettes (contraction), d'un complexe QRS correspondant à la dépolarisation des ventricules et d'une onde T correspondant à la repolarisation des ventricules. L'intervalle PR représente le temps nécessaire à la transmission de l'influx électrique des oreillettes aux ventricules. B) Représentation schématique du système de conduction cardiaque permettant la dépolarisation des oreillettes et ventricules. Ce groupe de cellules spécialisées présentes dans les membranes cardiaques envoie des signaux électriques à partir du nœud sinusal dans l'oreillette droite du cœur vers les ventricules, les obligeant à se contracter et à pomper le sang.

[http://www.mediwiki.fr/%C3%89lectrocardiogramme_\(ECG\).](http://www.mediwiki.fr/%C3%89lectrocardiogramme_(ECG).)

Table 9. Définition des degrés et types de blocs cardiaques

Degré du bloc				
Degré	Définition			
1°	- Ralentissement de la conduction au niveau du nœud AV - Allongement de la conduction sino-atriale			
2°	- Blocage complet et ponctuel de l'onde P - Disparition de complexe QRS après un allongement progressif de l'intervalle PR			
3°	Absence totale d'onde P : contraction ventriculaire dissociée			
Type de bloc				
Bloc sino-atrial	Atteinte du nœud sinusal			
Bloc atrio-ventriculaire	Atteinte du nœud AV			
	Bloc de branche	Branche gauche du faisceau de His (PG)		Bloc trifasciculaire
		Branche gauche du faisceau de His (AG)	Bloc bifasciculaire	
	Branche droite du faisceau de His			

AV : auriculo-ventriculaire ; PG : postérieure gauche ; AG : antérieure gauche

même moment n'apparaît pas sur l'ECG car leur repolarisation est plus faible comparativement à la dépolarisation des ventricules. Enfin, l'onde T correspond à la relaxation des ventricules. L'intervalle PR est le temps entre le début de l'onde P et le début du QRS. Il est le témoin du temps nécessaire à la transmission de l'influx électrique des oreillettes aux ventricules.

Les battements du cœur sont générés et contrôlés par le système de conduction cardiaque (Figure 40B). Chaque battement cardiaque est déclenché automatiquement par le pacemaker naturel du cœur que l'on appelle le nœud sinusal. Le signal électrique généré dans le nœud sinusal s'étend aux oreillettes et a pour effet que celles-ci se contractent et propulsent automatiquement le sang dans les ventricules. L'impulsion électrique est ensuite conduite vers le nœud AV (nœud auriculo-ventriculaire). Le nœud AV a pour fonction de transmettre l'impulsion électrique des oreillettes aux ventricules avec un petit délai de temps permettant la fonction optimale du cœur. De ce nœud part une sorte de tronc nerveux qu'on appelle le tronc du faisceau de HIS. Celui-ci, après un court trajet entre les deux ventricules se divise en deux : la branche droite du faisceau de HIS et la branche gauche, elle-même divisée en deux. Dès que l'influx les parcourt, les ventricules vont se contracter. Les blocs cardiaques, qui sont des retards ou des blocages de la conduction cardiaque, peuvent se produire à n'importe quel niveau de ce réseau (Table 9). En cas de blocage complet de la conduction cardiaque, un pacemaker ectopique prend le relais dans les ventricules assurant leur contraction mais de manière non efficace. Ce phénomène mène à ce que l'on nomme l'arythmie ventriculaire de réentrée.

2.3.2. Anomalies du cœur de patients DM1

L'implication cardiaque sous la forme d'arythmie ou de défauts de conduction est fréquente chez les patients DM1 car se produit dans 50-65% des cas (Groh *et al.*, 2008; Cudia *et al.*, 2009; Petri *et al.*, 2011). Cependant de plus en plus de rapports indiquent que les anomalies de structure du myocarde peuvent être interdépendantes des anomalies de l'ECG. La Table 10 récapitule l'ensemble des symptômes cardiaques identifiés chez les patients DM1.

2.3.2.1. Anomalies de structure

Parmi les anomalies de structure récurrentes, il y a l'hypertrophie du ventricule gauche (Nguyen *et al.*, 1988; Bhakta *et al.*, 2004; Hermans *et al.*, 2012; Dhand *et al.*, 2013; Rakocevic Stojanovic *et al.*, 2013) et/ou la dilatation des oreillettes ou ventricules (Nguyen *et al.*, 1988; Bhakta *et al.*, 2004; Said *et al.*, 2006; Hermans *et al.*, 2012; Dhand *et al.*, 2013). Les biopsies ou autopsies indiquent également la présence de fibrose non généralisée (Nguyen *et al.*, 1988; Muraoka *et al.*, 2005; Hermans *et al.*, 2012).

Table 10. Manifestations cardiaques des patients DM1

Référence	Effectif	Troubles du rythme				Troubles de la conduction				Insuffisance cardiaque				Altérations de la structure cardiaque			
		Arythmie auriculaire		Arythmie ventriculaire	Bloc Sino-atrial	Bloc atrio-ventriculaire	Dysfonction systolique	Dysfonction diastolique	Hypertrophie du VG	Dilatation auriculaire	Dilatation ventriculaire	Fibrose	Prolapsus de la valve mitrale	Arythmie non précisée		Fibrillation / Flutter	
		non précisée	Fibrillation / Flutter														
Dhand et al., 2013	27	-	1/25	-	-	8/25	5/27	4/27	2/27	-	-	-	3/27	-	-	-	3/27
Hermans et al., 2012	80	-	2/80	-	-	30/80	20/80	-	6/80	-	-	-	-	8/80	10/80	-	-
Bhakta et al., 2003	382	-	12/382	-	-	-	14/100	2/382	19/96	-	-	-	6/95	18/97	-	-	13/95
Nguyen et al., 1988	12	-	3/12	-	3/12	6/12	-	-	7/12	-	-	-	4/12	3/12	8/12	-	-
Groh et al., 2008	406	31/406	-	8/406	-	-	13/104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Olofsson et al., 1988	65	-	7/65	-	-	21/63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bassez et al., 2004	11	-	5/11	4/11	1/11	7/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cudia et al., 2009	245	13/63	4/63	7/63	11/63	18/63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stojanovik et al., 2013	171	-	5/171	-	-	45/171	-	-	2/171	-	-	-	-	-	-	-	-
Morner et al., 2010	30	-	1/30	-	-	12/25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	44/669	40/839	19/480	15/86	147/460	52/311	6/409	36/386	13/134	29/189	18/92	16/122	13/134	9.70%	15.30%	19.60%	13.10%
%	9.40%	4.80%	4.00%	17.4%	31.90%	16.70%	1.50%	9.3%	9.70%	15.30%	19.60%	13.10%	9.70%	15.30%	19.60%	13.10%	13.10%

VG : ventricule gauche

2.3.2.2. Troubles de la conduction

Les blocs les plus fréquents dans la DM1 sont les blocs atrio-ventriculaires et plus particulièrement les blocs de branche (Nguyen *et al.*, 1988; Olofsson *et al.*, 1988; Cudia *et al.*, 2009; Morner *et al.*, 2010; Hermans *et al.*, 2012; Dhand *et al.*, 2013; Rakocevic Stojanovic *et al.*, 2013). Mais les praticiens rencontrent également quelques cas de blocs sino-auriculaires (Nguyen *et al.*, 1988; Cudia *et al.*, 2009). La fibrose du myocarde mentionnée précédemment est mise en cause dans la dégénération du système de conduction cardiaque à l'origine des troubles de la conduction observés chez les patients.

2.3.2.3. Troubles du rythme

Les principaux troubles du rythme sont les arythmies auriculaires incluant la fibrillation² et le flutter³, fréquemment observés chez les patients (Nguyen *et al.*, 1988; Olofsson *et al.*, 1988; Bhakta *et al.*, 2004; Groh *et al.*, 2008; Cudia *et al.*, 2009; Hermans *et al.*, 2012; Dhand *et al.*, 2013; Rakocevic Stojanovic *et al.*, 2013). Dans une moindre mesure, sont recensées les arythmies ventriculaires avec flutter ou tachycardie (Said *et al.*, 2006; Groh *et al.*, 2008; Cudia *et al.*, 2009). L'arythmie ventriculaire est extrêmement néfaste puisque cause de mort subite (Groh *et al.*, 2008). Elle peut trouver son origine dans une cardiomyopathie hypertrophique ou encore un prolapsus de la valve mitrale comme observés dans quelques études sur les patients DM1 (Bhakta *et al.*, 2004; Dhand *et al.*, 2013).

2.3.2.4. Insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque est définie comme l'incapacité du myocarde à assurer un débit cardiaque suffisant. On parle de dysfonction systolique lorsque la cause est une anomalie de contraction du muscle cardiaque ventriculaire et de dysfonction diastolique lorsqu'il s'agit d'une anomalie du remplissage ventriculaire. Dans le cas des patients DM1, il y a une forte prévalence de dysfonction systolique (Bhakta *et al.*, 2004; Groh *et al.*, 2008; Hermans *et al.*, 2012; Dhand *et al.*, 2013) mais l'on rencontre malgré tout quelques cas de dysfonction diastolique (Bhakta *et al.*, 2004; Dhand *et al.*, 2013). Parmi les causes de la dysfonction systolique en général, on retrouve la fibrillation auriculaire et les troubles de la conduction tous deux bien représentés chez les patients DM1.

2.3.4. Prédicteurs de mort subite

Bien qu'un lien ait été établi entre détresse respiratoire et arythmie puisqu'il semblerait que le risque de trouble de la conduction soit trois fois supérieur chez les patients avec une maladie pulmonaire restrictive (Kaminsky *et al.*, 2013), la diversité des symptômes et leur

² Tachycardie irrégulière de l'oreillette

³ Tachycardie régulière de l'oreillette

gravité n'ayant toujours pas pu être corrélées à la taille des expansions, on ne peut prédire, individuellement, le risque de mort subite à un patient afin de lui assurer un meilleur suivi.

Traditionnellement, la mort subite est associée aux troubles de la conduction cardiaque qui affectent la plupart du temps le faisceau de HIS (Nguyen *et al.*, 1988; de Die-Smulders *et al.*, 1998; Mathieu *et al.*, 1999). Lui sont également associés les tachyarythmies ventriculaire et auriculaire (Groh *et al.*, 2008). Afin de mieux comprendre le lien entre les symptômes cardiaques pour proposer une prise en charge plus adaptée, une séquence de causes et conséquences se dessine. En effet, la fibrose pourrait entraîner une dégénérescence du système de conduction cardiaque qui constituerait un substrat pour l'arythmie ventriculaire de réentrée. Cependant, il reste difficile d'intégrer l'ensemble des complications cardiaques dans un modèle unique dont l'origine est une seule et même mutation (bien que dynamique) (Muraoka *et al.*, 2005; Sovari and Karagueuzian, 2011).

Le tube cardiaque de la Drosophile a une structure proche du cœur embryonnaire de vertébré. L'étude de la mise en place du tube cardiaque a permis, par transposition, de mieux connaître les facteurs de transcription et voies de signalisation mis en jeu dans la cardiogenèse vertébrée. La facilité de mise en œuvre de l'étude de la fonction cardiaque chez la Drosophile pourrait permettre de mieux comprendre les causes de la diversité des symptômes cardiaques des patients DM1 récapitulée dans la Table 10.

Tg26

11



Expression multisystémique du transgène

Figure 41. Représentation schématique de la construction du transgène de la lignée Tg26

Les souris Tg26 possèdent 25 copies d'un transgène contenant le gène *DMPK* humain avec 11 répétitions CTG (et le dernier exon de *DMWD*).

Reproduit d'après Gomes-Pereira *et al.*, 2011

V. Les modèles animaux de la DM1

Les animaux sont couramment utilisés comme modèles de pathologies humaines pour disséquer les mécanismes moléculaires sous-jacents aux maladies musculaires humaines dans le but de développer des stratégies thérapeutiques. Il est largement accepté que les modèles mammifères sont parfaitement adaptés à de telles études. Cette dernière décennie, la découverte de la conservation des mécanismes qui contrôlent le développement musculaire et la réparation du muscle a mené à la mise en place de nombreux modèles invertébrés de maladies musculaires humaines (Chartier *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006; Ocorr *et al.*, 2007; Shcherbata *et al.*, 2007). Mais naturellement, les premiers modèles développés suite à l'identification de la mutation à l'origine de la DM1 ont été les modèles murins.

1. Modèles murins

Les modèles de souris de la DM1 ont principalement permis de valider la thèse de la toxicité de l'ARNm muté plutôt que celle de l'happloinsuffisance en protéine DMPK comme cause majeure de la DM1.

1.1. Invalider la thèse de l'happloinsuffisance

En effet, dans un premier temps, des souris *Dmpk*^{-/-} et *Six5*^{-/-} ont été générées mais n'ont pas permis de reproduire le phénotype multi-systémique de la DM1, suggérant que l'happloinsuffisance des gènes du locus DM1 n'est pas le mécanisme primaire de cette maladie (Jansen *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1996; Klesert *et al.*, 2000; Sarkar *et al.*, 2000). Cependant, il a été tout de même observé que l'inactivation de *DMPK* altère l'homéostasie des ions dans le cœur et les muscles alors que l'inactivation de *SIX5* augmente la susceptibilité à la cataracte, réduit la fertilité et affecte la fonction cardiaque.

1.2. Modèles transgéniques du gain de fonction toxique de l'ARN muté

Une seconde génération de lignées transgéniques visant à exprimer les répétitions toxiques a grandement permis de disséquer ce mécanisme encore inconnu de maladie.

1.2.1. Souris exprimant le locus *DMPK* humain

Un premier modèle de souris avec plusieurs insertions du gène humain *DMPK* contenant seulement 11 répétitions CTG a d'abord été généré (Figure 41) (Jansen *et al.*, 1996).

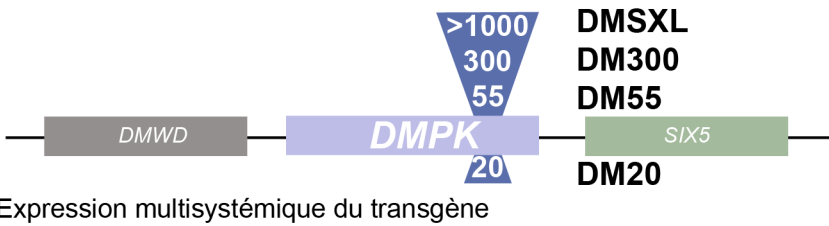


Figure 42. Représentation schématique de la construction du transgène des lignées DM

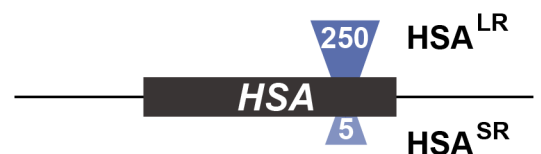
Les souris DM20, DM300 et DMSXL possèdent 1 à 3 copies du locus DMPK humain avec respectivement 20, ~300-600 et 1000-1800 répétitions CTG.

Gomes-Pereira *et al.*, 2011

Figure 43. Représentation schématique de la construction du transgène des lignées HSA

Les souris HSA^{SR} et HSA^{LR} portent plusieurs copies du fragment du gène *HSA* (*Human skeletal actin*) contenant dans son exon terminal respectivement 5 ou 250 CTG. 1-20 copies du transgène pour la lignée HSA^{SR}. 1-12 copies du transgène pour la lignée HSA^{LR}.

Gomes-Pereira *et al.*, 2011



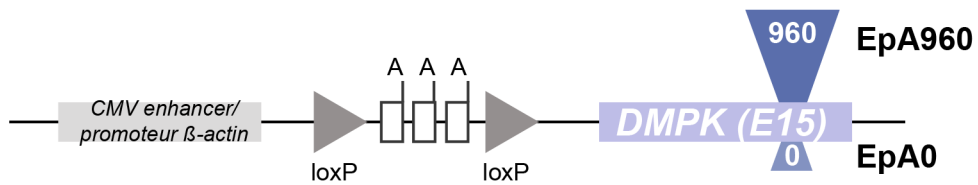
Expression tissu-spécifique du transgène :
muscle squelettique et jonction neuromusculaire

Les souris de la lignée Tg26 présentent une cardiomyopathie et une myotonie des muscles squelettiques associée à une diminution du marquage CLCN1 (Jansen *et al.*, 1996; O'Coirlain *et al.*, 2004). Ce modèle Tg26 ne permet pas de faire la distinction entre l'effet de l'accumulation de courtes répétitions qui pourrait être toxique, et la surexpression de la protéine DMPK.

Un second modèle exprimant le gène *DMPK* humain muté dans son locus permet de conserver *a priori* la régulation spatio-temporelle de ce gène. Une première souris homozygote contenant 320 répétitions CTG dans le gène *DMPK* (DM300, Figure 42) a été générée et présente des *foci* ribonucléaires dans les muscles squelettiques, le cœur le système nerveux central. Ce modèle DM300 présente des phénotypes clés de la DM1 tels que myotonie, faiblesse musculaire progressive, histopathologie musculaire, trouble du métabolisme du glucose lié à l'âge associé à un défaut d'épissage du récepteur à l'insuline, retard de croissance et mortalité élevée (Seznec *et al.*, 2001; Guiraud-Dogan *et al.*, 2007; Vignaud *et al.*, 2010). Par ailleurs, au niveau du cerveau, la distribution altérée des isoformes des protéines MAPT/Tau (Seznec *et al.*, 2001) ressemble à celle des patients (Sergeant *et al.*, 2001). L'instabilité germinale des répétitions du locus humain a permis de générer des souris dites DMSXL portant >1000 répétitions CTG à partir des souris DM300 (Gomes-Pereira *et al.*, 2007). Les souris hémis ou homozygotes DMSXL expriment les transcrits sens et anti-sens de *DMPK* humain dans de très nombreux tissus mais plus fortement dans les muscles squelettiques et le cœur (Huguet *et al.*, 2012). De ce fait, des foci sont détectables à la fois avec les sondes sens et anti-sens dans ces tissus. Les souris DMSXL ont une létalité de 60% au cours du premier mois de vie. Les survivantes présentent un retard de croissance, des fibres musculaires plus courtes et moins épaisses, une force musculaire et une performance motrice réduites (Huguet *et al.*, 2012). Au niveau du cerveau, l'expression du transgène entraîne des anomalies comportementales et cognitives, une diminution du niveau de dopamine et de métabolites de la sérotonine, ainsi que l'augmentation des protéines des vésicules synaptiques RAB3A et SYN1 respectivement par une augmentation du niveau des transcrits *Rab3a* suite à la séquestration de MBNL1 et à la phosphorylation de SYN1 par CUGBP1 (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2013).

1.2.2. Expression de répétitions non codantes seules

Afin d'évaluer la toxicité des répétitions CTG en dehors de leur contexte, l'équipe de Charles Thornton a utilisé le gène humain *HSA* (human skeletal actin) pour exprimer ~250 CUG non codants dans les muscles squelettiques murins (Figure 43). Les souris transgéniques ainsi générées sont appelées *HSA^{LR}* et ne permettent une étude que du muscle squelettique adulte (le transgène ne s'exprimant pas dans les cellules précurseurs du muscle). L'expression des répétitions CUG non codantes cause une mortalité élevée des lignées ainsi que de la myotonie (Mankodi *et al.*, 2000). D'un point de vue moléculaire, l'expression du transgène entraîne la séquestration de MBNL1 perturbant ainsi l'épissage de *Clcn1*, *Serca1*, *Mbnl1*, *Ldb3* (Lin *et al.*,

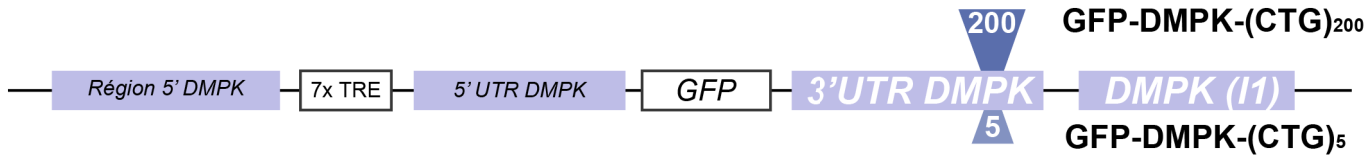


Expression conditionnelle tissu-spécifique du transgène :
muscle squelettique ou coeur

Figure 44. Représentation schématique de la construction du transgène des lignées EpA

Les souris inductibles EpA portent l'exon 15 de *DMPK* humain contenant soit 0 soit 960 répétitions CTG interrompues. L'expression est permise par l'enhancer du cytomégalovirus (CMV) et le promoteur de la β -actine. La cassette de polyadénylation entre les sites loxP empêche l'expression du transgène en absence de recombinaison. L'administration de Tamoxifène induit la recombinaison par la Cre de manière tissu-spécifique permettant de supprimer la cassette de polyadénylation et favorisant l'expression du transgène.

Gomes-Pereira *et al.*, 2011



Expression conditionnelle tissu-spécifique du transgène :
muscle squelettique ou coeur

Figure 45. Représentation schématique de la construction du transgène des lignées GFP-DMPK-(CTG)_n

Les souris GFP-DMPK-(CTG)_n possèdent un élément de réponse à la tétracycline (TRE) dans la région promotrice de *DMPK*. En aval, la séquence de la GFP est fusionnée à la région 3' non traduite de *DMPK* contenant 5 ou 200 répétitions CTG. Ces animaux expriment de manière constitutive le transactivateur inverse de la tétracycline. En présence de doxycycline, le transactivateur se lie au TRE et active l'expression du transgène *GFP-DMPK-(CTG)_n*.

Gomes-Pereira *et al.*, 2011

2006). Dans ce modèle, MBNL1 co-localise bien avec les foci mais CUGBP1 n'est pas surexprimé dans le muscle squelettique (Lin *et al.*, 2006).

Le système Cre-lox a également été utilisé pour générer une souris qui exprime 960 répétitions CTG interrompues localisées dans l'exon 15 de *DMPK* sous contrôle du promoteur du gène *β -actine* inductible au tamoxifène. Ce modèle est appelé EpA960 (Figure 44). L'expression du transgène dans le cœur ou les muscles squelettiques induit séquentiellement la formation de *foci*, la séquestration de MBNL1, l'hyperphosphorylation et l'accumulation de CUGBP1 (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Orengo *et al.*, 2008). Lorsque exprimées dans le cœur, les répétitions induisent des troubles électrophysiques et histopathologiques de la DM1 puis le décès des souris dans les 2 semaines (Wang *et al.*, 2007). Dans les muscles squelettiques, les souris développent de la myotonie, une histopathologie et une dégénérescence progressive du muscle (Orengo *et al.*, 2008). La toxicité potentielle des interruptions des répétitions et la fuite d'expression du transgène sont deux limites de ce modèle.

1.2.3. Expression inductible et réversible de la région 3' non codante du gène *DMPK*

Des souris GFP-DMPK-(CTG)_n portent un promoteur modifié de *DMPK* contenant des éléments de réponse à la tétracycline et qui permet l'expression du transcrit de la GFP fusionnée à 5 ou 200 répétitions CTG (Figure 45). Ces animaux expriment aussi de manière constitutive un transactivateur de la tétracycline qui va se fixer sur ses éléments de réponse en présence de tétracycline et activer l'expression du transgène.

Les souris hémizygotés pour le transgène contenant 200 répétitions présentent des foci qui séquestrent MBNL1 mais pas de phénotypes apparents (Mahadevan *et al.*, 2006). Au contraire, les souris exprimant seulement 5 répétitions après induction à la doxycycline ne présentent pas de *foci* mais développent une myotonie et un électrocardiogramme anormal pouvant progresser jusqu'à la mort subite (Mahadevan *et al.*, 2006). De plus, la surexpression de (CTG)₅ induit l'expression du facteur de transcription cardiaque NKX2.5 et de ses cibles dans le muscle squelettique et le cœur de manière réversible lorsque l'on arrête le traitement à la doxycycline (Yadava *et al.*, 2008).

Ce modèle a deux défauts notables. Le premier est la fuite d'expression du transgène qui se traduit par de la myotonie chez les souris non induites à la tétracycline et entraîne leur décès vers l'âge de neuf mois. Le second est que l'on ne peut pas comparer l'effet des différentes tailles de répétitions car l'expression du transgène (CTG)₅ est plus importante que celle du transgène (CTG)₂₀₀, ce qui explique les différences phénotypiques observées entre ces deux lignées.

1.3. Modèles des régulateurs de l'épissage alternatif défectueux

La caractérisation des phénotypes moléculaires et physiologiques des modèles murins résultant de l'inactivation des MBNLs par séquestration et de l'accumulation de CUGBP1, indépendamment des expansions de triplets CTG, a permis de valider le rôle central de ces familles de régulateurs de l'épissage dans la pathogénèse de la DM1.

1.3.1. Les facteurs MBNLs

L'inactivation de l'exon 3 des isoformes de *Mbnl1* pouvant lier les répétitions CUG permet de mimer une séquestration extrême de MBNL1 par le transcrit *DMPK* muté. Les souris *Mbnl1*^{Δ3/Δ3} présentent une myotonie associée au mauvais épissage de *CLCN1* et une myopathie mais pas de dégénérescence musculaire (Kanadia *et al.*, 2003). De plus, l'inactivation de *Mbnl1* n'a que très peu d'effet sur l'épissage des transcrits du cerveau en cause dans les manifestations neurologiques de la DM1 (Suenaga *et al.*, 2012).

De ce fait, une souris invalidée pour *Mbnl2* a été générée (*Mbnl2*^{ΔE2/ΔE2}) et a permis de montrer que de nombreux défauts d'épissages similaires à ceux observés dans la DM1 sont reproduits dans l'hippocampe de ces souris (Charizanis *et al.*, 2012).

Les souris *Mbnl1*^{ΔE3/ΔE3} et *Mbnl2*^{ΔE2/ΔE2} récapitulent de nombreuses caractéristiques de la forme adulte de la DM1 mais n'ont pas permis de reproduire la fonte musculaire, manifestation clé de cette pathologie. Récemment, une souris invalidée pour *Mbnl3* a été générée (*Mbnl3*^{ΔE2/ΔE2}). Cette souris ne présente pas de phénotypes musculaires fœtaux ou post nataux précoces mais un retard de la régénération musculaire lié à l'âge (Poulos *et al.*, 2013).

1.3.2. Rôle de CUGBP1

La contribution de la surexpression de CUGBP1 dans la pathogénèse a été validée par trois modèles :

(i) La lignée CUGBP1-TR de Lubov Timchenko surexprime CUGBP1 dans les muscles squelettiques et le cœur dans une moindre mesure. Les souris transgéniques présentent un retard de croissance et du processus de myogénèse associé à une dystrophie musculaire et une diminution du nombre de fibres rapides contrebalancée par une augmentation du nombre de fibres lentes (Timchenko *et al.*, 2004).

(ii) La lignée MCKCUG-BP1 de Thomas Cooper surexprime CUGBP1 humain sous le contrôle du promoteur creatinin kinase (MCK) exprimé dans les muscles squelettiques et le cœur. Les descendants présentent une taille normale mais des anomalies histopathologiques de la DM1 ainsi qu'un épissage altéré de transcrits des muscles squelettiques (*Mttr1* et *Cln1*) et du cœur (*Tnnt2* et *Mttr1*) (Ho *et al.*, 2005a).

(iii) La mortalité importante de ces deux lignées a emmené l'équipe de Thomas Cooper à générer un nouveau modèle de surexpression de CUGBP1 par induction à la doxycycline appelé TRECUGBP1. L'induction dans les muscles squelettiques de TRECUGBP1 entraîne une diminution de la masse et de la fonction musculaire ainsi qu'une altération de l'épissage caractéristique de la DM1 (Ward *et al.*, 2010). L'expression du transgène dans le cœur cause une cardiomyopathie dilatée, des troubles de la conduction, une dérégulation de l'épissage similaire à celle observée chez les patients DM1 et la mort des souris dans les deux semaines qui suivent l'induction (Koshelev *et al.*, 2009).

2. Modèle de *C. elegans*

Les études menées sur le modèle de *C. elegans* ont permis de confirmer certains aspects de la pathogenèse de la DM1 mais le modèle n'a pas été davantage exploité. Des vers exprimant 5, 30, 83, 125 et 213 répétitions CUG non codantes ont été générés. Les animaux avec un nombre de répétitions inférieur ou égal à 83 ne présentent pas de phénotypes. Les animaux dits CUG213 meurent au cours de l'embryogenèse ou présentent un retard de croissance. Les vers CUG125 présentent une activité musculaire non coordonnée et une altération des cellules musculaires liée à l'âge (Chen *et al.*, 2007). Il a été démontré postérieurement que *Ce-Mbl*, l'orthologue de MBNL1, colocalise avec les *foci* formés par les répétitions et que sa séquestration médie en partie la toxicité de ces ARNs non codants (Wang *et al.*, 2011).

Une étude réalisée sur des mutants *unc-39*, l'orthologue de *SIX5*, a montré que les larves possèdent moins de cellules musculaires des parois et ont une locomotion affectée (Yanowitz *et al.*, 2004). De même, l'inactivation de *Ce-Mbl* par ARN interférence affecte la structure et la fonction musculaire des vers adultes mais pas des larves (Wang *et al.*, 2008). Récemment il a été montré l'implication de *Ce-Mbl* dans le système nerveux. En effet, la mutation *mb1-1* entraîne une perte des synapses distales du motoneurone DA9 affectant la locomotion arrière du ver (Spilker *et al.*, 2012).

ETR-1, l'orthologue présumé de *CUGBP1* chez *C. elegans* a une expression forte et spécifique des cellules musculaires. Cependant, si les injections d'ARN double brin contre *ETR-1* entraînent des phénotypes de paralysie du type des mutants Pat (myosinA, troponinC, vinculin, tropomyosine, perlecan), les auteurs rejettent la possibilité que *ETR-1* puisse avoir un rôle structural dans le muscle. Ils pensent plutôt à une régulation de l'expression de ces gènes sarcomériques par *ETR-1* (Milne and Hodgkin, 1999).

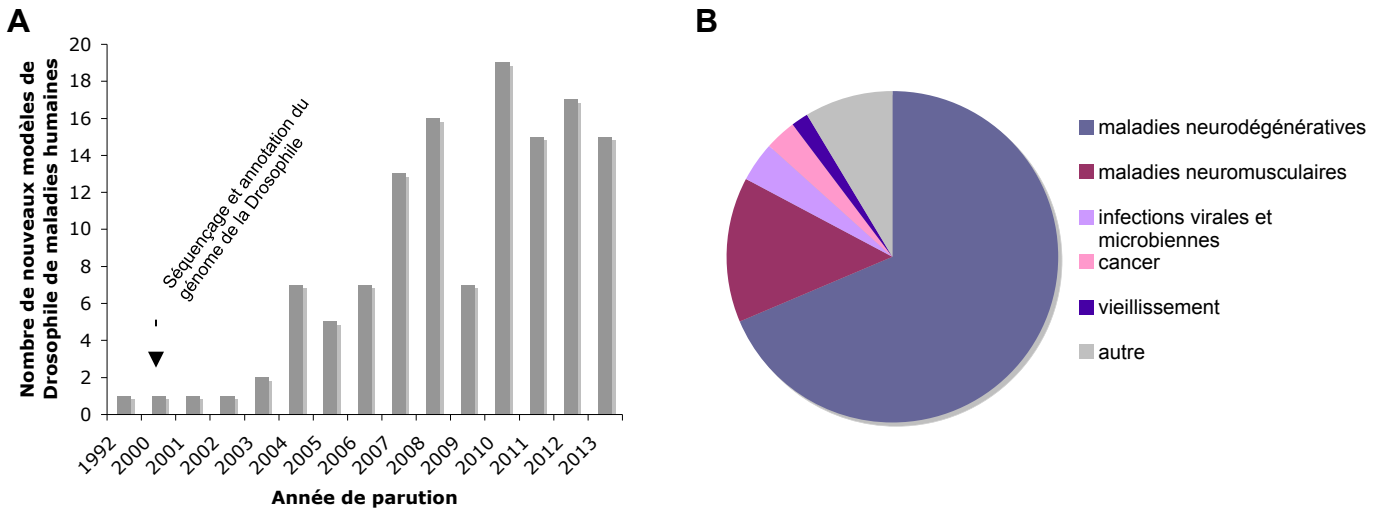


Figure 46. Développement des modèles de Drosophile de maladies humaines

A) Représentation du nombre de modèles émergents de Drosophile pour les maladies humaines en fonction de l'année de publication. La flèche positionne l'année de parution du séquençage et de l'annotation du génome de la Drosophile dans la chronologie. B) Distribution des différents modèles en fonction du type de maladie étudié. L'ensemble des données a été collecté jusqu'en juillet 2013 dans Pubmed à partir du logiciel Endnote à l'aide des mots clé « Drosophila model of » et a permis de recenser 127 modèles différents de Drosophile.

3. Modèles de *Drosophila*

3.1. Mouches modèles de pathologies humaines

3.1.1. L'explosion du nombre de modèles de mouche ou « *Drosophila model boom* »

Alcoolisme, cancer, obésité, immunité, maladies neurodégénératives ou neuromusculaires, autant de maux et de problèmes de santé publique qui touchent l'humain et pour lesquels le nombre de modèles de *Drosophila* ne cesse de croître depuis le séquençage et l'annotation du génome de la *Drosophila* en 2000 (Adams *et al.*, 2000) (Figure 46A). Comme l'indique la distribution en camembert des différents types de modèles, les maladies neurodégénératives et neuromusculaires sont les plus représentées (Figure 46B). A cela je pense qu'il y a deux raisons : (i) les maladies du système nerveux et musculaires sont nombreuses et diverses à affecter l'homme relativement à d'autres tissus ou sortes de pathologies et (ii) les systèmes nerveux et musculaires sont très étudiés chez la *Drosophila* favorisant le développement d'outils pour les recherches. L'engouement des chercheurs à utiliser la *Drosophila* comme modèle d'étude se justifie par les nombreux avantages économiques -gain de temps, d'espace et d'argent- et génétiques qu'elle procure.

3.1.2. Quels avantages la *Drosophila* offre-t-elle par rapport aux modèles vertébrés ?

Sur un plan pragmatique, les conditions d'élevage et les cycles de reproduction sont avantageux. Les cycles entre générations sont de 10 jours à 25°C seulement et permettent d'engendrer une quantité non négligeable de descendants. Le coût moyen pour l'entretien des mouches est de 20 centimes/mois pour 100 animaux alors que pour la souris ce coût est 10.000 fois supérieur (Kasai and Cagan, 2010).

D'un point de vue génétique, seulement 4 paires de chromosomes composent le génome de la *Drosophila*. Par ailleurs, le génotypage est simplifié par l'utilisation des chromosomes balanceurs. Ces chromosomes particuliers sont des chromosomes remaniés par des inversions chromosomiques multiples qui génèrent un produit non viable en cas de recombinaison avec un chromosome classique. Ces chromosomes sont porteurs d'une mutation morphologique dominante qui sert de marqueur pouvant être contre-sélectionné afin de ne conserver que les individus mutés pour le transgène d'intérêt. Par ailleurs, l'analyse génétique sur la mouche est bien souvent facilitée par l'absence de redondance des gènes contrairement à leurs orthologues vertébrés, et par des outils génétiques (systèmes UAS/GAL4, FLP/FRT) qui peuvent permettre de pallier la létalité d'une mutation en l'exprimant uniquement dans un tissu ou un clone somatique.

Enfin, le séquençage des génomes de l'homme et la *Drosophila* a montré, d'une part, qu'approximativement 77% des gènes humains impliqués dans des maladies possèdent un orthologue chez *Drosophila melanogaster* (Reiter *et al.*, 2001). D'autre part, cette avancée a

Table 11. Modèles de Drosophile de maladies neuromusculaires avec un apport pour l'homme ou les modèles mammifères

Maladie	Cause	Année de parution du modèle	Apports pour l'homme	
			Pathogénèse	Thérapie
Amyotrophie spinale (SMA)	mutation <i>SMN1</i>	Rajendra <i>et al.</i> , 2007	Caractérisation de la localisation de SMN dans la ligne Z (Walker <i>et al.</i> , 2008)	-
Syndrome de Barth	mutation <i>TAZ</i>	Xu <i>et al.</i> , 2006	Pas satisfaisant pour l'étude de la neutropénie (revue Aprikyan and Khuchua, 2013)	iPLA2-VIA cible thérapeutique potentielle (Malhotra <i>et al.</i> , 2009)
Dystrophie musculaire oculo-pharyngée (OPMD)	expansion GCG dans <i>PABPN1</i>	Chartier <i>et al.</i> , 2006	-	<ul style="list-style-type: none"> Intracorpore de lama (Chartier <i>et al.</i>, 2009) > Application chez la souris pour le traitement de la chorée de Huntington (Southwell <i>et al.</i>, 2009) et de la maladie d'Alzheimer (Suddol <i>et al.</i>, 2009) Drogue anti-prion (Barbezier <i>et al.</i>, 2011)
Dystrophie musculaire congénitale	<i>POMT1/2</i>	Wairkar <i>et al.</i> , 2008	Glycosylation de Dg par POMT (déjà démontré)	> Aucune publication connue sur le mammifère
Syndrome de Walker-Warburg	<i>POMT1/2</i>	Ueyama <i>et al.</i> , 2010		
Deficience primaire en coenzyme Q	mutation <i>coQ</i>	Grant <i>et al.</i> , 2010	-	-
Syndrome CHARGE	mutation <i>CHD7</i>	Melicharek <i>et al.</i> , 2010	-	-
Deficience en triose isomérase	mutation <i>TPI</i>	Celotto <i>et al.</i> , 2006	<ul style="list-style-type: none"> Rôle de Hsp70 et Hsp90 dans la dégradation de TPI muté => symptômes (Hrizo and Palladino, 2010) > Non vérifié chez l'homme 	<ul style="list-style-type: none"> Réduire le stress oxydatif (Hrizo <i>et al.</i>, 2013) > Aucune publication connue sur le mammifère
Maladie de Duchenne	mutation <i>DMD</i>	Shcherbata <i>et al.</i> , 2007	<ul style="list-style-type: none"> Interaction entre InR et Dg (Shcherbata <i>et al.</i>, 2007) > souris β-SG^{-/-} ont une diminution importante de Dg et sont résistantes à l'insuline (Groh <i>et al.</i>, 2009) Importance de Dys/Dg dans la signalisation de TGFβ (Kucherenko <i>et al.</i>, 2008) 	<ul style="list-style-type: none"> > Le traitement des chiens MD avec Bortezomib contre l'inflammation par TGFβ rétablit partiellement l'expression musculaire de Dg (Araujo <i>et al.</i>, 2013)

permis de compléter la base de donnée de référence, Flybase,(<http://flybase.org/>) qui recense un grand nombre d'informations sur les gènes connus et putatifs (profils d'expression, niveau d'expression, interactions physique et génétique) et sert d'interface aux banques de clones et de lignées transgéniques disponibles.

3.1.3. Un petit pas pour la mouche, un grand pas pour l'homme : focus sur quelques maladies neuromusculaires

La mise en place des modèles de *Drosophile* de maladies humaines étant récente, les apports pour l'homme restent encore à venir. Cependant, j'ai pu dénombrer déjà quelques modèles de mouche de maladies neuromusculaires (Table 11) ayant permis des avancées dans la compréhension des mécanismes mis en jeu dans la pathologie ou dans la mise en place de thérapies.

- *la dystrophie musculaire oculo-pharyngée (OPMD)*

Parmi ceux-ci, la dystrophie musculaire oculo-pharyngée (OPMD) se manifeste au cours de la vie adulte par des troubles de la déglutition et un ptosis (Brais, 2003) Elle est due à une courte expansion de triplets GCG dans le premier exon du gène *PABPN1* entraînant la formation d'une expansion poly-alanine dans la protéine mutée (Brais *et al.*, 1998). *PABPN1* muté forme des inclusions nucléaires insolubles pouvant potentiellement être en cause dans la pathogénèse. C'est pourquoi l'équipe de Martine Simonelig a mis au point un modèle de *Drosophile* de l'OPMD (Chartier *et al.*, 2006) sur lequel des intracorporels simple chaîne de lama ont été testés et ont permis d'identifier un intracorporel capable de sauver les phénotypes musculaires (Chartier *et al.*, 2009). Cette étude ainsi qu'une précédente réalisée sur un modèle de *Drosophile* de la chorée de Huntington (McLear *et al.*, 2008) ont ouvert la possibilité *in vivo* de traiter les maladies avec agrégats protéiques grâce à ces intracorporels. Les premières tentatives d'apport de ces intracorporels par vaccination ou thérapie génique ont été publiées sur des modèles murins de la maladie d'Alzheimer ou la chorée de Huntington (Southwell *et al.*, 2009; Sudol *et al.*, 2009).

- *La myopathie de Duchenne*

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique récessive liée au chromosome X. Elle affecte 1 naissance mâle sur 3 500 dans le monde. Cette maladie est causée par des mutations du gène *DMD* (Koenig *et al.*, 1988), qui code pour la protéine cytosquelettique nommée dystrophine (Dys), composante du complexe DGC. Dans 90% des cas, les mutations perturbent le cadre de lecture et génèrent une dystrophine anormalement tronquée, non fonctionnelle à l'origine de la DMD. Cependant dans 10% des cas de mutations, le cadre de lecture est maintenu et conduit à la production d'une protéine plus courte, mais partiellement fonctionnelle à l'origine de la dystrophie musculaire de Becker (BMD), une forme de dégénérescence musculaire moins grave et moins évolutive que la DMD. Un modèle de *Drosophile* de la DMD a été mis au point par Halyna Shcherbata et a permis de montrer pour la

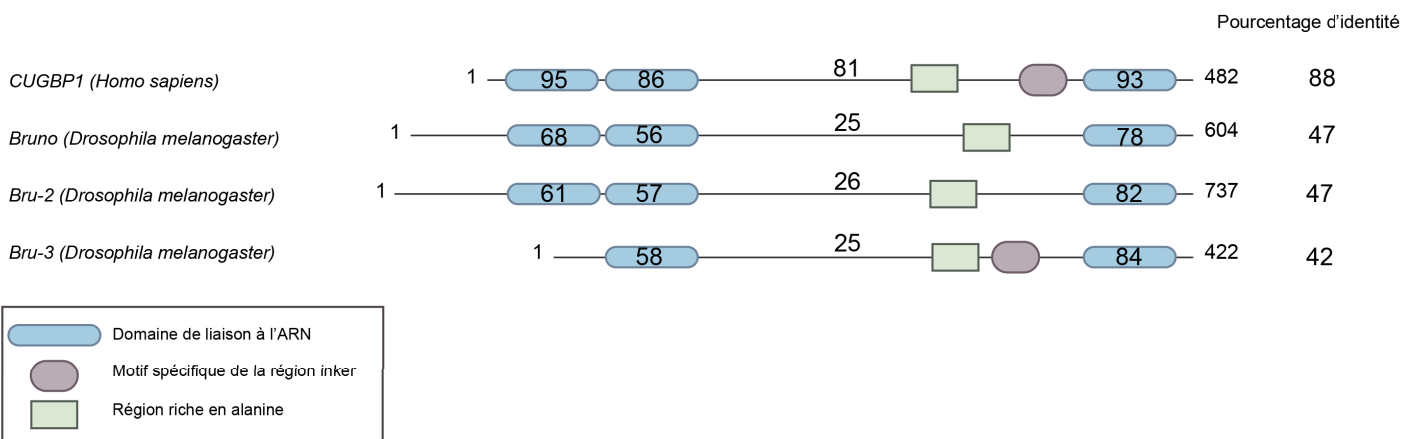


Figure 47. Comparaison des séquences protéiques de CUGBP1 avec ses orthologues potentiels chez la Drosophile

CUGBP1 possède 3 domaines de liaison à l'ARN (RRM1, RRM2, RRM3) représentés en bleu et un motif spécifique de la région linker représenté en rouge et composé de 35 acides aminés hydrophobes et aromatiques conservés. Des trois protéines Bruno, seule Bru-3 possède ce motif conservés entre les espèces, faisant de *bruno-3* un orthologue très probable de *CUGBP1* malgré l'absence du domaine RRM1.

première fois l'interaction génétique entre Dystroglycan (Dg) et le récepteur à l'insuline (Shcherbata *et al.*, 2007). Par la suite, il a été montré que les souris invalidées pour le β -sarcoglycan, un composant du complexe DGC, présentent une diminution importante du niveau de Dg associée à une résistance à l'insuline (Groh *et al.*, 2009). Un crible réalisé sur le modèle de Drosophile de la DMD a révélé que des composants de la voie TGF β sont des interacteurs du complexe DGC (Kucherenko *et al.*, 2008). Récemment, une étude menée sur plusieurs modèles murins de dystrophies musculaires dont la souris mdx, modèle de la DMD, montre que la voie TGF β 1 est activée dans le processus dystrophique (Onofre-Oliveira *et al.*, 2012). De même sur les chiens GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) qui présentent une plus forte expression de TGF β 1 dans le muscle squelettique. Un traitement contre l'inflammation due à TGF β a été testé sur ces chiens et restaure partiellement l'expression de Dg dans le muscle (Araujo *et al.*, 2013).

Il semblerait que la Drosophile va être de plus en plus utilisée dans les décennies à venir dans le cadre des recherches médicales. En effet, les études sur le mode patients/modèle de Drosophile ou réciproquement modèle de Drosophile/patients sont en pleine émergence. Par exemple, une étude impliquant plus de 180.000 patients a permis d'identifier de nouveaux loci impliqués dans les troubles du rythme et de la conduction cardiaque. L'implication des gènes candidats ressortis de cette analyse à grande échelle a ensuite été validée sur la Drosophile et le poisson zèbre (den Hoed *et al.*, 2013).

3.2. Conservation chez *Drosophila melanogaster* des facteurs d'épissage impliqués dans la DM1

3.2.1. *bruno-3 (bru-3)*, l'orthologue de *CUGBP1* de la *Drosophile*

S'il existe six protéines de la famille CELF chez l'homme- avec CELF1 pour CUGBP1-*Drosophila melanogaster* possède trois protéines CELF : Bruno ou Arrest (Bru / Aret), Bruno-2 (Bru-2) et Bruno-3 (Bru-3) (Good *et al.*, 2000).

Deux études dans les modèles DM1 de Drosophile ont été menées en lien avec CUGBP1/Bru. La première a consisté à apporter le facteur CUGBP1 humain dans une lignée DM1 afin d'aggraver la dégénérescence musculaire adulte (de Haro *et al.*, 2006). La seconde étude, réalisée sur le modèle de Glasgow, montre que *aret (bru)*, l'orthologue supposé de CUGBP1 et exprimé dans les gonades adultes, n'interfère pas avec les répétitions CTG et n'est pas responsable de la stérilité des femelles (Houseley *et al.*, 2005).

Bien que des analyses phylogénétiques suggèrent que Bru-3 appartient à la sous-famille des CELF3-6 et que Bru et Bru-2 appartiennent à la sous famille de CUGBP1-2 (Good *et al.*, 2000), une étude fonctionnelle de gels retards menée sur l'ensemble des orthologues de la Drosophile montre que *bruno-3* est l'orthologue de CUGBP1 bien qu'il ne possède pas le domaine RRM1 (Delaunay *et al.*, 2004) (Figure 47).

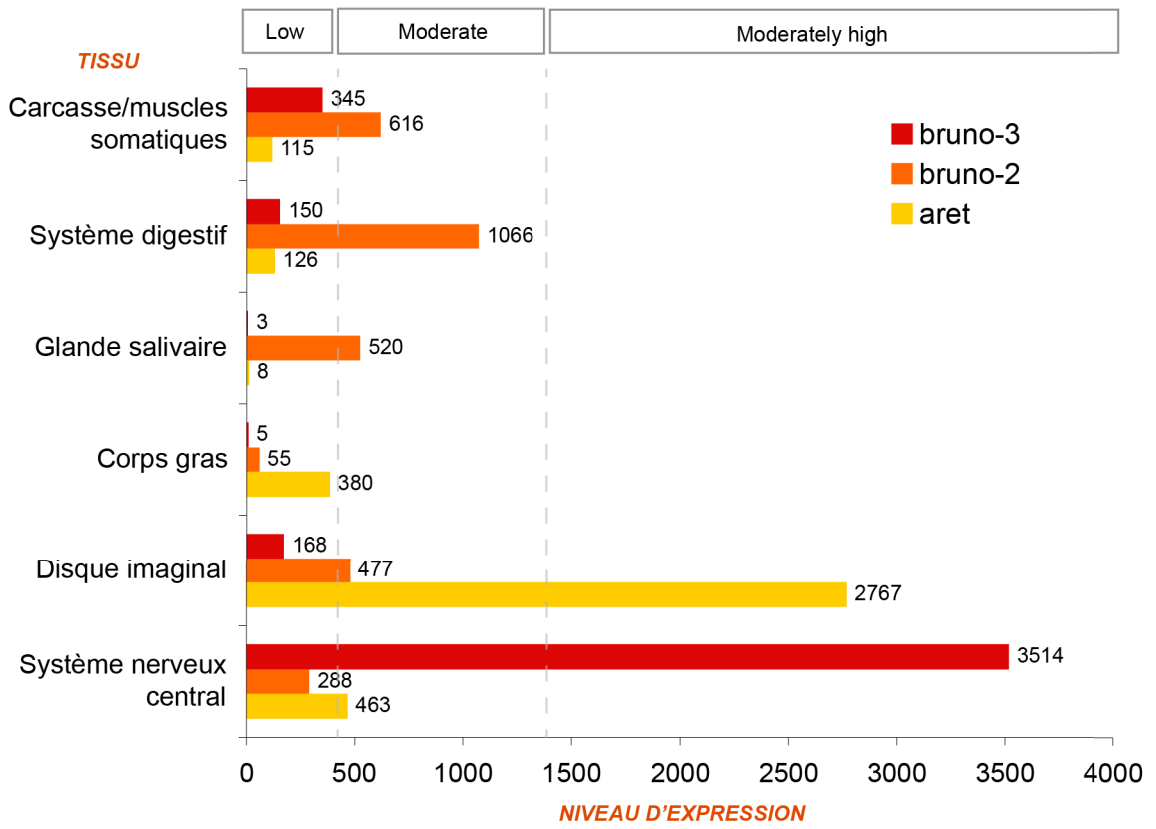


Figure 48. Expression au stade 3 larvaire des orthologues potentiels de CUGBP1 dans les différents tissus

Reproduit d'après les données modENCODE ; octobre 2012

A ce jour, le rôle de Bru a été amplement étudié dans le système ovarien de la *Drosophile*. Tout comme CUGBP1, il a été montré son implication dans la répression de la traduction (Kim-Ha *et al.*, 1995; Filardo and Ephrussi, 2003; Nakamura *et al.*, 2004; Sugimura and Lilly, 2006). En revanche, seule l'étude fonctionnelle révélant *bru-3* comme orthologue de CUGBP1 a été réalisée pour ce facteur (Delaunay *et al.*, 2004). Ainsi, son rôle en tant qu'orthologue de CUGBP1 dans la DM1 reste à démontrer. A commencer par son expression dans les tissus d'intérêt : muscles cardiaque et somatiques. Concernant ce dernier point, une hybridation *in situ* réalisée en embryon montre que *bru-3* a une expression ubiquitaire, mais les données ne sont pas montrées (Delaunay *et al.*, 2004). Les dernières données de modENCODE (octobre 2012) montrent que *bru-3* est fortement exprimé dans les larves de stade trois dans le système nerveux central ainsi que plus faiblement dans les muscles somatiques. L'expression de *aret /bru* pour ces mêmes tissus est plus faible (Figure 48).

Ainsi, le rôle de *bru-3* dans la DM1 reste à déterminer, ce que je développerai ultérieurement dans la partie Résultat de cette thèse.

3.2.2. *muscleblind (mbl)*, l'orthologue des MBNLs de la *Drosophile*

La similitude entre les protéines MBNLs des vertébrés et leur homologue chez *Drosophila melanogaster* (et les insectes en général) est principalement restreint au motif en doigt de zinc N-terminal. En effet, 79% et 80% de similarités pour les motifs TZF1 et TZF2 respectivement du domaine doigt de zinc N-terminal de MBNL1A avec Mbl de la *Drosophile* contre 49% de similarités pour le domaine C-terminal de l'isoforme F de Mbl (Irion, 2012). La région entre les doigts de zinc est très peu conservée. Les similitudes étant restreintes aux acides aminés hydrophobes ainsi que Gln, Met et Pro, il a été suggéré que ces résidus interviennent dans l'interaction de la protéine avec les régulateurs de l'épissage et les composants de la machinerie d'épissage. Alors que MBNL1 se fixe aux motifs YGCY (Goers *et al.*, 2010), son orthologue Mbl lie les motifs AGUCU et les structures II d'ARN (Goers *et al.*, 2008).

La protéine Mbl est localisée dans les noyaux grâce à son motif KRAEK (Fernandez-Costa *et al.*, 2012) où elle contrôle l'épissage dont les cibles identifiées à ce jour sont CG30084, l' α -actinine (Machuca-Tzili *et al.*, 2006), *up/Troponin T* (Vicente-Crespo *et al.*, 2008), *wupA/Troponin I*, CG33205, *cora (coracle)*, *kkv (krotzkopf-verkehrt)* et *Myofiline*. (Irion, 2012). Récemment, il a été montré que Mbl est également présente dans le cytoplasme au niveau des bandes sarcomériques où elle permet la localisation de BSF et TBPH (Llamusi *et al.*, 2012). Sa localisation dans les sarcomères corrèle avec un défaut d'organisation de la ligne Z observé préalablement sur le mutant hypomorphe MblE27 (Artero *et al.*, 1998).

3.3. Apports des différents modèles de *Drosophile* de la DM1

Jusqu'à présent, on recense quatre modèles de *Drosophile* de la DM1 dont deux ont permis des avancées sur la pathogénèse de la DM1 et l'identification de cibles thérapeutiques. Dans ces études, les analyses ont été réalisées sur des mouches adultes au niveau des muscles de vol ou des ommatidies, cellules de l'œil.

3.3.1. *Foci* non toxiques

Le premier modèle établi en 2005 est une lignée inductible constituée de ~ 100 pb de la région 3' non traduite du gène *DMPK* humain avec 11, 48, 56 ou 162 répétitions CTG insérée dans la région 3' non traduite du gène rapporteur GFP (Houseley *et al.*, 2005). Seule la lignée exprimant les 162 répétitions CTG non codantes (CTG)₁₆₂ présente des *foci* dans quelques noyaux de la musculature somatique larvaire et adulte qui co-localisent avec la protéine Mbl endogène et MBNL1 humain lorsque cette dernière est apportée. Cependant, aucun effet de l'expression de ces répétitions n'a pu être observé sur la durée de vie, la locomotion des mouches adultes ou l'ultrastructure du muscle.

Un second modèle inductible avec 16, 240 ou 480 répétitions CTG ou CAG a été généré. L'expression de ces répétitions dans les muscles somatiques larvaires, les glandes salivaires ou les ovaires ne permet la formation de *foci* que si le nombre de répétitions est grand (240 ou 480) et de nature CTG (plutôt que CAG) (Le Mee *et al.*, 2008). Comme observé précédemment, la taille des répétitions associée à la présence de *foci* ainsi que leur niveau d'expression n'affectent pas la viabilité des mouches ni la neurodégénérescence des ommatidies. De manière intéressante, la stabilité de la taille des répétitions a été évaluée après 100 générations de mouches et n'est pas remise en cause.

3.3.2. ARN non codant toxique contenant 480 répétitions CTG interrompues

Un modèle inductible par le système UAS/GAL4 de la DM1 a été généré et a permis de redémontrer dans un organisme invertébré, la conservation du mécanisme sous-jacent à la toxicité des répétitions CUG non codantes ((iCUG)₄₈₀). Dans ce modèle, l'expression de 480 répétitions CUG non codantes interrompues par le motif CUCGA entraîne la formation de *foci* dans les noyaux des muscles adultes (Garcia-Lopez *et al.*, 2011) et larvaires qui co-localisent avec l'isoforme C de Mbl (Garcia-Lopez *et al.*, 2008) ou la protéine humaine MBNL1 lorsqu'elle est apportée (de Haro *et al.*, 2006). La dégénérescence des muscles de vol liée à l'âge observée sur les mouches ((iCUG)₄₈₀) est aggravée par la surexpression de CUGBP1 ou rétablie par l'apport de MBNL1 (de Haro *et al.*, 2006).

Les phénotypes d'œil caractérisés par la désorganisation des ommatidies ont permis par la suite la réalisation d'un certain nombre de cribles sur cette lignée. Dans un premier temps, des interacteurs chimiques et génétiques des répétitions non codantes (Garcia-Lopez *et al.*, 2008; Garcia-Lopez *et al.*, 2011; Llamusi *et al.*, 2012) ont été recherchés. Récemment, un

Table 12. Récapitulatif des modèles de la DM1

Principe	Animal	Lignée	Phénotypes	
Haploinsuffisance	Souris	Dmpk ^{-/-}	• Homéostasie des ions dans le cœur altérée	
		Six5 ^{-/-}	• Cataracte, fertilité diminuée, fonction cardiaque altérée	
	<i>C. elegans</i>	Unc-39 (SIX5)	• Locomotion altérée, diminution du nombre de cellules musculaires	
Toxicité des répétitions CTG	Souris	Tg26	• Myotonie • Cardiomyopathie	
		DM300 DMSXL	• Foci, épissage affecté • Myotonie, myopathie	
		HSALR	• Foci, séquestration MBNL1, épissage affecté • Myotonie, myopathie	
		EpA960	• Foci, séquestration MBNL1, accumulation CUGBP1, épissage affecté • Myotonie, perte musculaire, myopathie • Cardiomyopathie, conduction cardiaque altérée, mortalité élevée	
		GFP-DMPK-(CTG) ⁵	• Epissage affecté • Myotonie, myopathie • Conduction cardiaque altérée	
	<i>C. elegans</i>	CUG125	• Foci, séquestration de Ce-MBL • Fonction motrice réduite, altération des cellules musculaires	
	<i>D. melanogaster</i>	(CTG) ₁₆₂	• Foci, séquestration MBNL1 humain et Mbl endogène	
		CTG240	• Foc i	
		i(CUG)480	• Foci, séquestration MBNL1 humain et Mbl endogène, expression altérée des miARNs • Dégénérescence des muscles du vol • Dégénérescence de l'oeil	
		(CAG)250(CTG)250	• Foci, génération de siARNs • Dégénérescence de l'oeil	
	Implication des régulateurs de l'épissage	Souris	<i>Mbnl1</i> ^{Δ3/Δ3}	• Epissage affecté • Myotonie, myopathie • Cardiomyopathie
			<i>Mbnl2</i> ^{ΔE2/ΔE2}	• Epissage altéré des transcrits de l'hippocampe
<i>Mbnl3</i> ^{ΔE2/ΔE2}			• Retard de régénérescence musculaire lié à l'âge	
CUGBP1-TR			• Retard de croissance, retard du processus de myogénèse, dystrophie musculaire	
MCKCUG-BP1			• Epissage affecté • Myopathie	
TRECUGBP1			• Epissage affecté • Fonction motrice réduite, myopathie, masse musculaire réduite • Cardiomyopathie, conduction cardiaque altérée, mortalité élevée	
<i>C. elegans</i>		mb1-1	• Locomotion affectée	
<i>D. melanogaster</i>		MblE27	• Désorganisation de la ligne Z, hypercontraction de l'embryon	

crible a été réalisé (120 mélanges de peptides contenant chacun 2,5 millions d'hexapeptides) et a permis d'identifier ABP1 qui permet de sauver le phénotype des mouches (iCUG)₄₈₀ en diminuant le nombre de *foci* formés et la séquestration de Mbl dans ces foci. Ceci est permis grâce à un switch de la conformation double brin à la conformation simple-brin des répétitions (Garcia-Lopez *et al.*, 2011). Dernièrement, un crible a été réalisé pour identifier des protéines de liaison à l'ARN pouvant moduler l'effet des répétitions CUG (de Haro *et al.*, 2013). Cette étude a montré que Smaug1, un régulateur de la traduction chez l'homme, interagit avec CUGBP1 diminuant la formation de complexes CUGBP1-eIF2 inactifs et restaurant ainsi la traduction des cibles de CUGBP1 (de Haro *et al.*, 2013).

Enfin, une étude transcriptomique sur ce modèle a permis de redémontrer les rôles des répétitions non codantes et de la séquestration de Mbl dans l'altération de l'expression des mi-ARNs (Fernandez-Costa *et al.*, 2012) (voir le paragraphe « II.2.5.1. Implication des miARNs dans la DM1 »).

3.3.3. Modèle de DM1 mimant la transcription bidirectionnelle des répétitions CTG

Le modèle provenant de Philadelphie de Nancy Bonini exprime de manière inducible 19 à 250 répétitions pures non interrompues positionnées en 3' du gène rapporteur DsRed (Yu *et al.*, 2011). Dans cette étude, la transgénèse réalisée n'est pas site-spécifique. Cependant les lignées ayant une expression comparable des transcrits avec une taille croissante de répétitions ont été utilisées et ont permis de visualiser des *foci* et de montrer que la neurodégénérescence de l'œil dépend des facteurs temps et taille des répétitions. Ce modèle a permis de tester la toxicité de l'expression d'un transcrit anti-sens au gène *DMPK* évoqué précédemment. La co-expression de transcrits CTG/CAG chez la Drosophile nommée (CAG)₂₅₀(CTG)₂₅₀ aggrave la neurodégénérescence de l'œil et génère des siARNs de manière dépendante de *dcr-2* et *ago-2*. Un modèle similaire à celui-ci qui co-exprime ~100 CTG et ~100 CAG montre que la toxicité de ces ARNs est dépendante de la signalisation Toll et est atténuée par l'autophagie (Samaraweera *et al.*, 2013). En effet, la réduction de l'expression de récepteurs ou de ligands de la voie Toll dans les lignées exprimant les répétitions diminue l'effet de neurodégénérescence des ommatidies.

La Table 12 récapitule l'ensemble des modèles de la DM1 et leurs caractéristiques moléculaires et phénotypiques.

OBJECTIFS DE TRAVAIL

La Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1) est une maladie génétique à transmission autosomique dominante. Elle est due à une mutation dynamique qui correspond à une expansion instable de triplets CTG non codants. Au début de ma thèse en 2009, l'hypothèse physiopathologique majeure expliquant l'atteinte multi-systémique de la DM1 était celle d'un effet *trans*-dominant de l'ARN *DMPK* muté sur l'épissage alternatif. En effet, il était largement admis que la majorité des défauts d'épissage observés chez les patients DM1 et les modèles murins de la maladie étaient dus aux altérations de biodisponibilité des facteurs CUGBP1 et MBNL1.

Mes travaux de thèse avaient pour but de générer un modèle de Drosophile de la DM1 permettant l'induction d'un nombre croissant de répétitions CTG interrompues dans la musculature somatique et/ou cardiaque. Le caractère site-spécifique des lignées DM1 avec variation du nombre de répétitions devait enrichir les modèles existants : il devait permettre d'observer un effet de la taille des répétitions sur la sévérité des phénotypes et à plus long terme sur les perturbations du transcriptome.

Dans le but de mieux comprendre l'implication de MBNL1 et CUGBP1 dans cette pathologie, 2 lignées ont été testées en parallèle des lignées DM1 inductibles : (i) une lignée gain de fonction *bruno-3* qui mime la stabilisation de CUGBP1 dans les muscles des patients DM1 et (ii) une lignée atténuée pour *muscleblind (mbIRNAi)* qui mime la disponibilité réduite de MBNL1 dans les muscles des patients. Au moment de la prise de cette décision, le rôle de Mbl dans les muscles embryonnaires était déjà connu (Artero *et al.*, 1998) et avait déjà été exploité dans un premier modèle de Drosophile de la DM1 (Garcia-Lopez *et al.*, 2008). De ce fait, cette lignée devait servir de contrôle positif. En revanche, très peu d'informations étaient disponibles sur *bruno-3* si ce n'est que fonctionnellement il semblait être l'orthologue de *CUGBP1* (Delaunay *et al.*, 2004).

Mes travaux de thèse ont eu pour but de répondre à trois questions ?

- 1) Peut-on observer un effet de la taille des répétitions sur les phénotypes musculaires somatiques et le transcriptome dès les stades larvaires ?
- 2) Quel est le rôle de *bru-3*, l'orthologue de *CUGBP1*, dans le muscle et à quel point est-il impliqués dans les phénotypes de DM1 ?
- 3) Quels sont les phénotypes cardiaques développés par les différentes lignées pathologiques de la DM1 au stade adulte et comment évoluent-ils dans le temps ?

Présentation des résultats

Article 1: Novel *Drosophila* model of Myotonic Dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome wide view of altered gene expression. *Human Molecular Genetics*, 2013.

Des lignées site-spécifiques pouvant exprimer de manière inductible 240, 600 ou 960 répétitions CTG interrompues ont été générées. L'expression des transgènes dans le muscle somatique larvaire entraîne la formation de *foci* pouvant séquestrer Mbl dont la taille et le nombre est positivement corrélé à la taille des répétitions. L'analyse phénotypique de ces lignées couplée à une analyse transcriptomique montre que les fibres musculaires larvaires sont plus petites pour au moins deux raisons : (i) les fibres sont hypercontractées et (ii) moins de myoblastes fusionnent pour former la fibre musculaire. Ces deux altérations dépendantes de la déplétion en Mbl sont respectivement causées par une diminution de l'isoforme transmembranaire de dSERCA, pompe calcique ATP-dépendante, et une diminution du transcrit de *Mp20* dont la protéine de liaison à l'actine régule la fusion.

Article 2: *Drosophila* CUGBP1 orthologue, *Bruno-3*, contributes to muscle phenotypes of Myotonic Dystrophy type 1 and regulates sarcomere components synthesis (en préparation).

Un anticorps a été généré contre une courte séquence spécifique de la protéine Bru-3. Les immunomarquages indiquent que Bru-3 est faiblement exprimé dans le noyau et fortement exprimé dans le cytoplasme de part et d'autre des lignes Z et autour des noyaux. Les phénotypes larvaires des lignées gain de fonction *bru-3* (*Mef>bru-3*) et DM1₉₆₀ avec une déficience en *bru-3* (*DM1₉₆₀,df(bru-3)*) ont été comparés aux phénotypes musculaires des larves DM1₉₆₀ (*Mef>960CTG*). Cette comparaison montre que Bru-3 est en partie impliqué dans les défauts de fusion des myoblastes. En revanche, la protéine n'intervient pas dans les phénotypes d'hypercontraction musculaire.

Une analyse transcriptomique a été réalisée sur les larves *Mef>bru-3* comparativement aux larves *Mef>960CTG*. Une classification indépendante des GO montre que l'expression des gènes impliqués dans la protéolyse et l'apoptose, le métabolisme et le transport est dérégulée dans les deux sens. Au contraire, l'expression des gènes impliqués dans les processus d'oxydo-réduction et l'assemblage des filaments est principalement diminuée. J'ai validé par RT-qPCR la diminution d'expression de 12 gènes codants pour des composants sarcomériques et ai réalisé des immunomarquages pour ceux dont les anticorps étaient disponibles (Mhc, Prm, Tm2, Zasp52 et Actn). De manière surprenante, les niveaux protéiques n'étaient pas diminués mais la localisation de certaines protéines était altérée (Mhc et Actn) en contexte pathologique.

Projet 3 : Quelle est l'implication de Mbl et Bru-3 dans la fonction cardiaque des Drosophiles modèles de la DM1 ?

Afin d'avoir une meilleure compréhension de l'origine de la diversité des symptômes cardiaques dans la DM1, j'ai réalisé une analyse physiologique sur les cœurs de mouches adultes de 1 et 5 semaines pour les différents contextes pathologiques. La fonction cardiaque n'étant pas vitale pour la Drosophile, cela m'a permis d'examiner l'évolution dans le temps des phénotypes cardiaques que l'on ne peut pas forcément voir avec les modèles vertébrés. De manière surprenante, la lignée atténuée pour *mbl* (*Hand>mblRNAi*) développe une cardiomyopathie dilatée, un symptôme rare chez les patients DM1 (Gunkel *et al.*, 2000). Au contraire, les lignées gain de fonction *bru-3* (*Hand>bru-3*) et DM1 (*Hand>600CTG* et *Hand>960CTG*) développent des phénotypes rythmiques de type fibrillation/flutter qui semblent évoluer dans le temps vers ce qui pourrait s'apparenter à une insuffisance cardiaque (battement de cœur en trois temps).

L'ensemble de ces données semble indiquer que chez la Drosophile, Bru-3 serait impliqué dans les phénotypes cardiaques des lignées DM1 alors que la déplétion en *mbl* contribuerait plutôt aux phénotypes des muscles somatiques.

RESULTATS ET DISCUSSION

« La gratification vient avec l'acte, pas avec le résultat. »

James Dean

« James Dean n'était certainement pas chercheur »

Réflexion personnelle

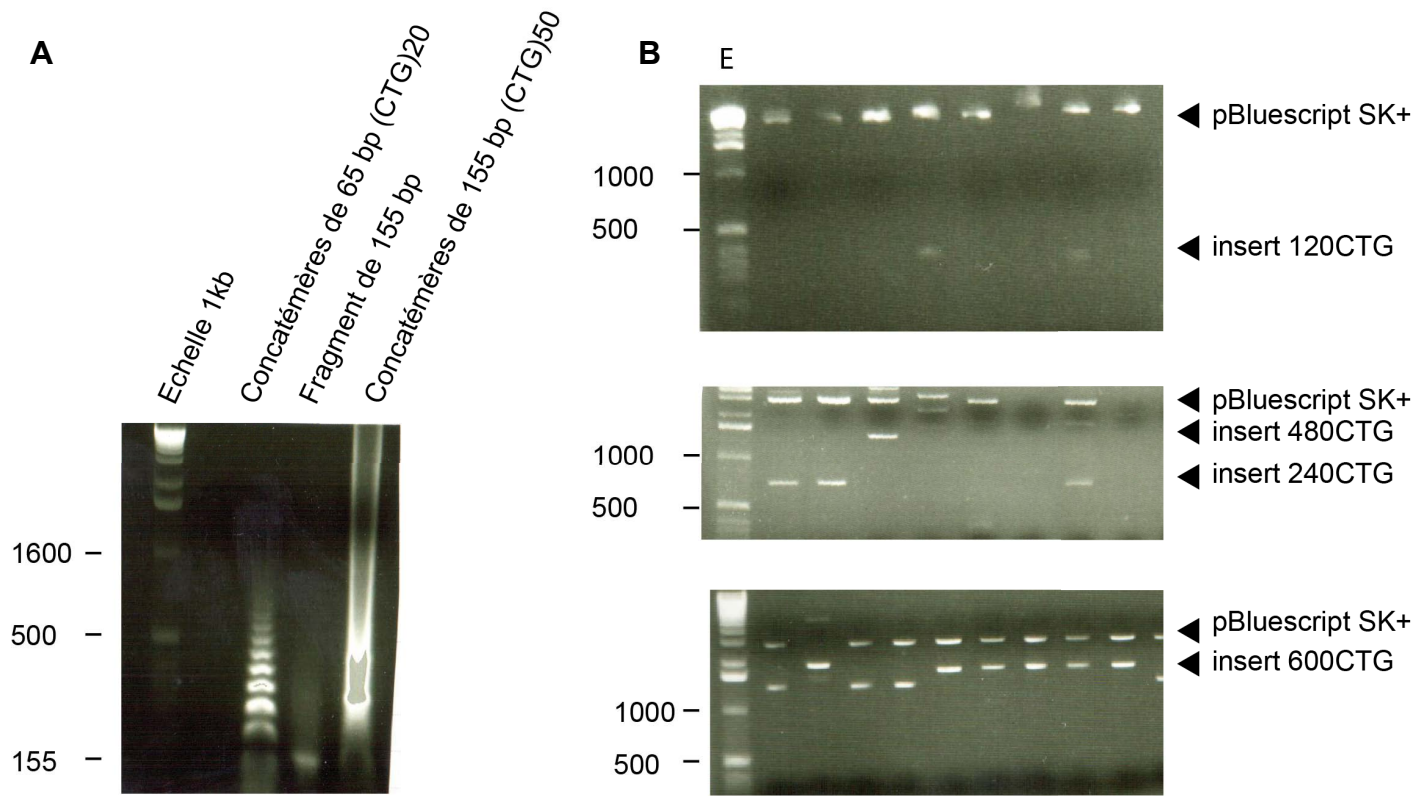


Figure 49. Gels d'agarose présentant la mise en place des lignées

A) Gel d'agarose après concatamérisation des fragments de 65bp contenant 20CTG ou des fragments de 155bp contenant 50CTG. B) Vecteur pBluescript digéré avec Sall/XhoI pour vérifier l'insertion des répétitions et leur taille. E : échelle de 1 kb.

I. Mise en place d'un nouveau modèle de Drosophile de la DM1 et implication de Mbl dans la pathologie

1. Stratégie expérimentale de la mise en place du modèle

La première étape de mon travail a consisté à créer de nouvelles lignées de Drosophile modèles de la DM1. Afin d'innover par rapport à la lignée DM1 déjà existante qui exprime 480CTG interrompus et inductibles (de Haro *et al.*, 2006), j'ai choisi de créer plusieurs lignées site-spécifiques avec un nombre croissant de répétitions CTG. Ces lignées sont également inductibles avec des répétitions interrompues, mais elles doivent pouvoir permettre de voir l'effet du facteur temps/taille des répétitions sur les phénotypes et les transcriptomes.

La stratégie de mise en place des lignées exprimant 240CTG, 480CTG et 600CTG est présentée dans l'annexe 1. Il s'agissait de réaliser des clonages successifs de concatémères de 20CTG ou 50CTG dans le vecteur pBluescript SK+. Il s'est avéré que la concatémérisation fonctionne mieux avec des fragments de 20CTG plutôt que 50CTG (Figure 49A). L'amplification des plasmides a été réalisée dans les bactéries Sure pour contrôler la stabilité des répétitions et éviter le risque de contraction. Une fois la taille d'intérêt atteinte, les répétitions ont été sous-clonées dans le vecteur de transgénèse pUASTattb qui permet une intégration site-spécifique de la construction *via* la séquence attb d'une part et l'induction de l'expression des répétitions d'autre part *via* la séquence UAS. Les clonages successifs pour rallonger le nombre de répétitions n'ont pas permis d'aller au-delà de 600CTG (Figure 49B). C'est pourquoi, pour la construction avec 960CTG interrompus, j'ai extrait les répétitions CTG du vecteur DT960 de Thomas Cooper qui a permis de générer la souris modèle EpA960 (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007). La stratégie de sous-clonage des répétitions dans un nouveau vecteur adapté au modèle de Drosophile est présentée dans l'annexe 2.

2. Article 1 : Novel Drosophila model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome wide view of altered gene expression.

Suite à la génération des lignées DM1, la première partie de mon travail a été de caractériser leurs muscles somatiques larvaires relativement à ceux de la lignée atténuée pour Mbl. Cette description a donné lieu à un article publié dans Human Molecular Genetics.

Article1 :

Novel Drosophila model of myotonic dystrophy type 1 : phenotypic characterization and genome wide view of altered gene expression

Picchio L, Plantie E, Renaud Y, Poovthumkadavil P, Jagla K

Human Molecular Genetics, 2013, Vol. 22, No.14

Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression

Lucie Picchio, Emilie Plantie, Yoan Renaud, Preethi Poovthumkadavil and Krzysztof Jagla*

GReD (Genetics, Reproduction and Development laboratory), INSERM U1103, CNRS UMR6293, University of Clermont-Ferrand, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France

Received February 11, 2013; Revised and Accepted March 13, 2013

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a multisystemic RNA-dominant disorder characterized by myotonia and muscle degeneration. In DM1 patients, the mutant *DMPK* transcripts containing expanded CUG repeats form nuclear foci and sequester the Muscleblind-like 1 splicing factor, resulting in mis-splicing of its targets. However, several pathological defects observed in DM1 and their link with disease progression remain poorly understood. In an attempt to fill this gap, we generated inducible transgenic *Drosophila* lines with increasing number of CTG repeats. Targeting the expression of these repeats to the larval muscles recapitulated in a repeat-size-dependent manner the major DM1 symptoms such as muscle hypercontraction, splitting of muscle fibers, reduced fiber size or myoblast fusion defects. Comparative transcriptional profiling performed on the generated DM1 lines and on the *muscleblind (mbl)-RNAi* line revealed that nuclear accumulation of toxic CUG repeats can affect gene expression independently of splicing or Mbl sequestration. Also, in *mblRNAi* contexts, the largest portion of deregulated genes corresponded to single-transcript genes, revealing an unexpected impact of the indirect influence of *mbl* on gene expression. Among the single-transcript Mbl targets is *Muscle protein 20* involved in myoblast fusion and causing the reduced number of nuclei in muscles of *mblRNAi* larvae. Finally, by combining *in silico* prediction of Mbl targets with *mblRNAi* microarray data, we found the calcium pump dSERCA as a Mbl splice target and show that the membrane dSERCA isoform is sufficient to rescue a DM1-induced hypercontraction phenotype in a *Drosophila* model.

INTRODUCTION

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a common neuromuscular disorder affecting 1 in 8000 people worldwide. DM1 patients display myotonia, muscle weakness and degeneration, together with insulin resistance, cataracts, cardiac conduction defects and hypogonadism.

This autosomal-dominant disease is caused by an unstable CTG triplet expansion in the 3' untranslated region of the *DMPK* gene (1,2). The severity and age of onset of DM1 are correlated with the number of repeats (3). Briefly, normal individuals have 5–37 CTG repeats, patients with the adult or childhood form display from 50 to 1000 CTG repeats, and congenital DM1 patients can have several thousand triplet repeats.

Despite the complexity of DM1 pathogenesis, it is now well established that non-coding CUG repeat transcripts play a toxic gain-of-function role. Abnormal *DMPK* transcripts form secondary structures (4), which aggregate into foci within muscle nuclei (5,6) and which sequester RNA-binding proteins such as Muscleblind-like 1 (MBNL1) (7). Also, by a still undetermined mechanism activating protein kinase C, CUG-binding protein 1 (CUGBP1) is stabilized by phosphorylation (8). MBNL1 and CUGBP1 are both splicing factors, but play antagonistic roles (9). Thus, in DM1 patients, several transcripts are mis-spliced due to an inverse ratio of MBNL1/CUGBP1. Among mis-spliced transcripts, insulin receptor (*IR*) (10), chloride ion channel-1 (*CIC-1*) (11), Bin1 (12) and troponin T (*cTNT*) (13) are involved in insulin resistance, myotonia, muscle weakness and reduced myocardial

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 473178181; Fax: +33 473276132; Email: christophe.jagla@udamail.fr

function observed in patients. However, recent reports (14,15) indicate that other molecular aberrations such as altered maturation of miRNAs or CUG repeat-dependent transcription factors leaching can also contribute to the pathogenesis of DM1. To characterize molecular defects underlying this pathology, several animal models have been generated. The first to be developed were mice models (8,16,17), but it was found that *Drosophila* also represented an accurate model system to study DM1 (18,19). Accordingly, fruit flies expressing CUG repeats in adult muscles develop DM1 symptoms (18,20) and were used to screen modifiers of transcript toxicity (21,22). Recently, applying a *Drosophila* model has revealed the role of the anti-sense *DMPK* transcript in DM1 pathogenesis (19). It has also been shown that Muscleblind (Mbl), the *Drosophila* MBNL1 ortholog, as in humans, is involved in muscle phenotypes observed in DM1 flies (20,21).

In this study, we report on the generation and phenotypic characterization of a novel *Drosophila* DM1 model composed of inducible transgenic lines carrying increasing numbers of CTG repeats inserted into the same genomic locus. To date, it is the only DM1 model which allows assessing effects of CTG repeats size. We show that by targeting CTG repeat expression or Mbl attenuation to embryonic and larval muscles, the DM1-like muscle defects can be detected as early as in third instar larvae. We also observe that the number of nuclear foci in muscle nuclei depends on the repeat size and that these foci sequester Mbl. As observed in patients (23,24), DM1 larvae display altered muscle morphology with splitting fibers and affected muscle function manifested by hypercontraction and impaired motility. We also demonstrate that under pathological conditions, larval muscles have a reduced number of nuclei due to affected myoblast fusion.

In an attempt to get further insights into DM1 pathogenesis, we used our model for comparative genome-wide analyses of gene expression and provide a large-scale view of repeat-dependent versus Mbl-dependent gene deregulation. The transcriptomic approach has been complemented by an *in silico* prediction of Mbl targets. These analyses revealed a set of genes whose deregulation appears Mbl-independent and more generally splice-independent. Among candidates whose deregulation is splice-independent, we found that the reduced transcript levels of *Muscle protein 20 (Mp20)* gene were involved in myoblast fusion defects observed in DM1 larva. We also found *dSERCA* transcript as a target of Mbl and showed that the missplicing of *dSERCA* transcripts leads to a decrease of its transmembrane isoform, resulting in altered muscle contractility.

RESULTS

Expanded CUG repeats accumulate in nuclear foci and sequester Mbl in a new *Drosophila* larval model of DM1

In order to better understand the effect of the repeat size on muscle parameters in DM1 patients, we generated a novel *Drosophila* model of DM1. Four inducible (*UAS-iCTG*) transgenic *Drosophila* lines carrying 240, 480, 600 and 960 interrupted CTG repeats were created. The link between these interruptions and DM1 symptoms remains unclear, but one could consider a possibility of additive effect in all so far generated animal models carrying interrupted CTG repeats

including our model. To avoid effects of insertion sites on transgene expression, we applied a phage C31 integrase-driven site-specific transgenesis system (25,26). In previously described *Drosophila* DM1 models, only adult muscles and in particular the indirect flight muscles have been targeted and analyzed. However, there are two waves of myogenesis during the *Drosophila* life cycle. The first wave leads to the formation of larval musculature. The second wave, occurring during metamorphosis, gives rise to the adult fly muscles. We reasoned that targeting muscle cells from the early developmental stages with increasing number of repetitions would result in affecting larval muscles. To test this hypothesis, we first analyzed larval muscles for nuclear foci formation which are associated with DM1 pathogenesis (5,6). When crossed to a muscle-specific *Mef-GAL4* driver, the *UAS-iCTG* repeat lines led to the synthesis of a non-coding RNA expressed at the same level in larval somatic muscles in all DM1 lines (Fig. 1A). Nevertheless, the longer the repeats are, the more foci we could detect in larval muscle nuclei. No foci could be observed in the DM1₂₄₀ line, only few foci were detected in DM1₄₈₀ (not shown) or DM1₆₀₀ lines, whereas numerous foci were present in the DM1₉₆₀ line (Fig. 1B). Since in a given line all muscle nuclei displayed a similar pattern of foci, we estimate that the *Mef-GAL4*-induced pan-muscular expression of the *iCTG* transgenes was relatively homogenous. Thus, the presence and the repeat-size-dependent abundance of nuclear foci suggest that larval musculature can be suitable for analyzing DM1 phenotypes.

It has been shown in DM1 patients (8) and in DM1 model organisms (15,16) that the foci forming repeats sequester MBNL1/Mbl factor involved in splicing. We thus tested whether in our larval *Drosophila* DM1 model the Mbl protein also associates with foci. We found that Mbl co-localizes with foci in muscle nuclei (Fig. 1C), suggesting that in lines expressing a high number of CUG repeats the level of functional Mbl protein is strongly reduced. To mimic in the *Drosophila* model the decreased availability of MBNL1 observed in DM1 patients we used a *UAS-mblRNAi* line allowing targeted attenuation of *mbl* gene expression. The validity of this line in the larval model was assessed, respectively, by qRT-PCR (Fig. 1D) and by immunodetection (Fig. 1E), showing that after muscle-specific attenuation, the overall *mbl* expression fell to ~50% (Fig. 1D) and that the Mbl protein in larval muscle nuclei was barely detectable (Fig. 1E). Accordingly, the muscle-targeted attenuation of *mbl* was subsequently used as a positive control condition.

Embryonic and larval lethality of pathological lines was assessed. We found that the expression of 960 CTG repeats in muscles was lethal in ~30% of embryos (Fig. 1F), but shorter non-coding CUG transcripts did not affect embryonic viability. It is noteworthy that the *Mef > mblRNAi* line displayed a moderate embryonic lethality (~17%), increasing to >30% in larval stages (Fig. 1F).

Reduced motility and affected muscle morphology of DM1 larvae

Third instar *Drosophila* larvae have well-developed locomotor behavior and are well-suited for assessing muscle performance using behavioral tests. Here, we used a contraction assay

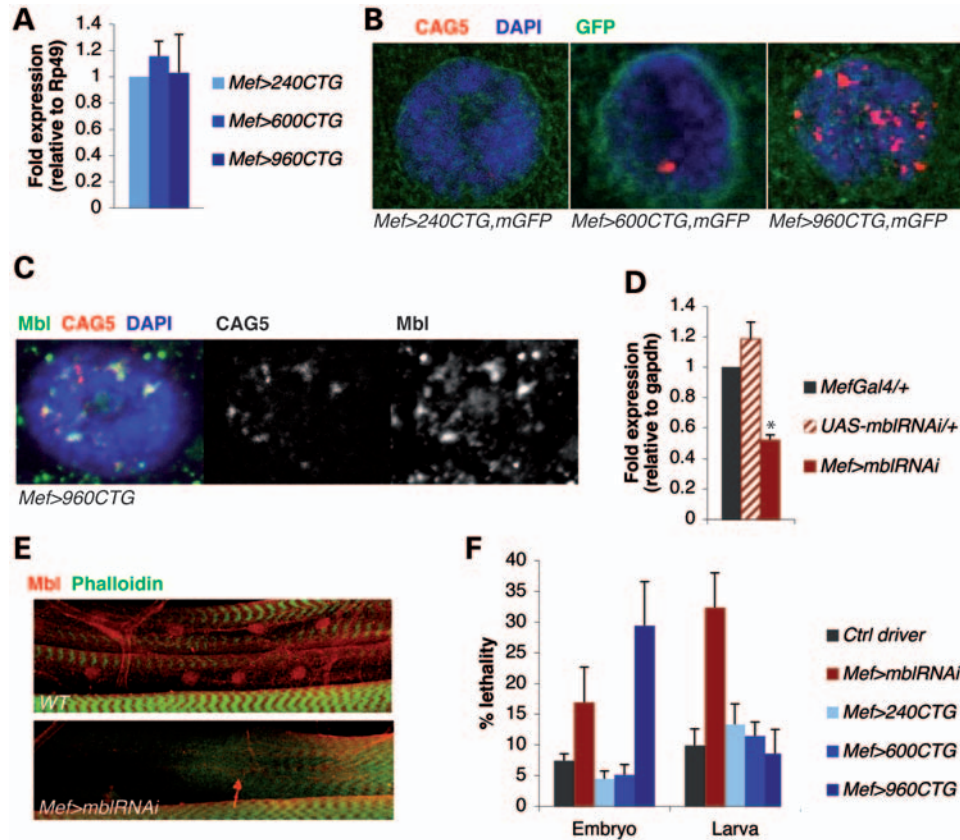


Figure 1. Validation of a new site-specific larval *Drosophila* model of DM1 and Mbl attenuated line. (A) RT-qPCR shows that site-specific third instar larvae expressing 240 CUG, 600 CUG and 960 CUG repeats in somatic muscles produce the same level of CUG transcripts. (B) *In situ* hybridization using a Cy3-labeled CAG probe was performed on larval muscles expressing GFP. Nuclei were stained with DAPI. CUG repeats accumulated in nuclear foci (red) in a size-dependent manner. No foci could be detected in *Mef>240CTG* muscle nuclei, 1–2 foci could be detected in *Mef>600CTG* muscle nuclei and several foci are visualized in *Mef>960CTG* muscle nuclei. (C) *Mef>960CTG* larval muscle nuclei after immunofluorescence and *in situ* hybridization. Mbl protein in nuclei stained with DAPI (blue) was detected by immunostaining (green) and co-localized with nuclear foci visualized with Cy3-labeled CAG probe (red). (D) RT-qPCR indicates that small RNAs expressed against *mbl* decreased by 50% global *mbl* transcript expression in *Mef>mblRNAi* third instar larvae. (E) Immunostaining against Mbl shows that Mbl was normally expressed in larval somatic muscle nuclei in the WT context, whereas Mbl expression could no longer be detected in larval somatic muscle nuclei in the *Mef>mblRNAi* line. (F) Average percentage of dead embryos and dead larvae are represented with SEM for each transgenic line (*Mef>GFP*, $n_{\text{embryos}} = 351$, $n_{\text{L1larvae}} = 172$; *Mef>mblRNAi*, $n_{\text{embryos}} = 142$, $n_{\text{L1larvae}} = 105$; *Mef>240CTG*, $n_{\text{embryos}} = 246$, $n_{\text{L1larvae}} = 120$; *Mef>600CTG*, $n_{\text{embryos}} = 528$, $n_{\text{L1larvae}} = 236$; *Mef>960CTG*, $n_{\text{embryos}} = 102$, $n_{\text{L1larvae}} = 128$). * $P = 0.050$ versus *UAS-mblRNAi/+*.

(Fig. 2A) and a righting assay (Fig. 2B) to test the capacity of larvae to perform ordinary and complex movements, respectively (27). For the contraction assay, the number of peristaltic contractions performed by the larva within 30 s was recorded. An average of one contraction per second was performed in control lines, whereas under pathological conditions this number was significantly reduced. However, the pathological line with a large number of repeats (*Mef>960CTG*) and the *mbl RNAi* line, both performed slightly better than milder pathological lines. This can be explained by less extensive contractions in these lines, which could compensate for the number of contractions. For the righting assay, we put the larva in a dorsal position and recorded the time needed to revert to the crawling position. Control lines needed between 2 and 5 s, whereas the *mbl* attenuated line and the different DM1 lines needed a significantly longer time ranging from 10 s in the case of 240 CTG repeats to 20 s in the case of 960 CTG repeats (Fig. 2B). Thus, motility was affected in these lines. It is noteworthy that motility was also affected

in the line *Mef>240CTG* which did not display detectable foci. In order to understand why motility is impaired, we analyzed the morphology of muscles and their pattern in mutant lines. We found several morphological abnormalities in body wall musculature of *Mef>mblRNAi* and DM1 larvae such as muscle splitting as well as loss of muscle fibers or presence of extra fibers (Fig. 2C). The average number of defects observed was significantly increased in pathological lines compared with the control line. Interestingly, the greater the number of repeats in DM1 lines, the more morphological defects we observed (Fig. 2D), a phenotype that correlates with the affected motility (Fig. 2B). The only exception was the DM1₉₆₀ line, which displayed a significantly increased rate of splitting muscles compared with other DM1 lines, but a lower rate of extra fibers (Fig. 2D). We hypothesized that extra fibers could be a consequence of splitting that the affected muscles underwent from one end to the other. As we did not detect any extra fibers in DM1 embryos (Fig. 2D), extra fibers do not form by abnormal specification,

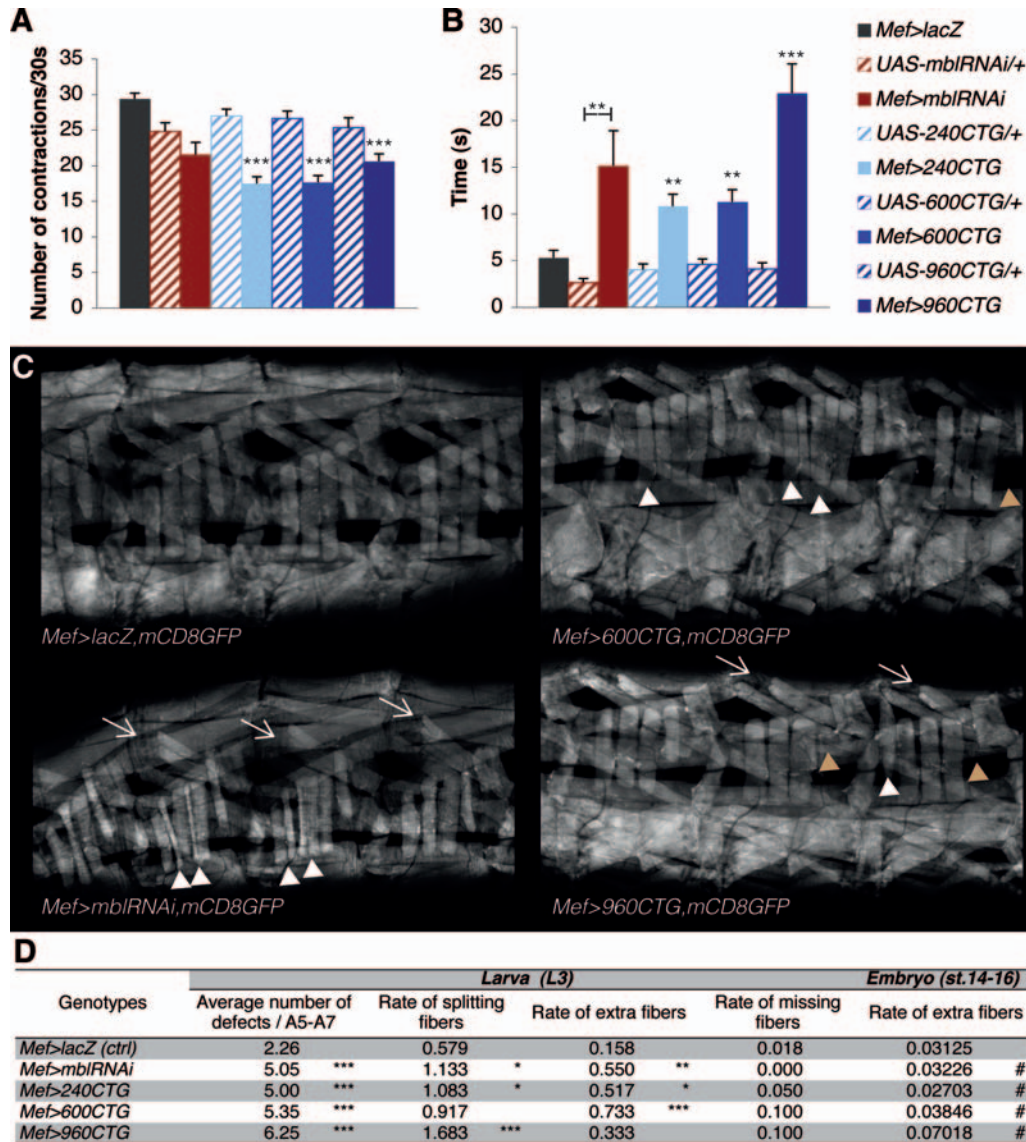


Figure 2. Altered motility in DM1 larvae is associated with an affected muscle pattern including splitting fibers. (A and B) Third instar larvae behavioral assays. (A) DM1 larvae display a crawling phenotype compared with controls (driver control and transgenic control). The graph shows the average number of larval peristaltic contractions/30 s recorded for each genotype. (B) DM1 larvae and *Mef>mblRNAi* line exhibit difficulty in performing complex movements compared with controls (driver control and transgenic control). The graph depicts the average time recorded for the larvae of each genotype to turn over. (C and D) Assessment of the overall muscle pattern and muscle abnormality quantification. (C) Images of *in vivo* scanning of the global muscle pattern carried out on third instar larvae segments A5–A7. Arrows point to splitting fibers. White arrowheads indicate extra fibers, brown arrowheads indicate missing fibers. (D) Table recapitulating the frequency of each defect observed *in vivo* for each mutant line but also the frequency of extra fibers in late embryos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus *Mef>lacZ* line.

but rather result from the affected integrity of growing muscles, leading to their fragmentation during larval stages. In the case of the DM1₉₆₀ line, which exhibited relatively high lethality during the late embryonic stage (Fig. 1E), a reduced rate of extra fibers observed may be due to the fact that individuals with increased muscle fragmentation do not survive until the first larval instar.

It is well known that in cell culture, the fusion ability of DM1 myoblasts or satellite cells is altered (28,29), impacting on the myotube size. We thus examined in our larval *Drosophila* DM1 model whether the muscle size and the number of nuclei per muscle were affected. As shown in Figure 3A, the

size of relaxed VL3 fibers was significantly decreased in DM1₆₀₀ and DM1₉₆₀ lines and in the line attenuated for *mbl* compared with their respective controls. Besides that, the number of nuclei per muscle was significantly reduced (Fig. 3B and C), indicating that the fusion process was affected in these pathological lines and that *Mbl* was involved in regulating myoblast fusion. The same observation was made in SBM fibers where fusion was also affected in all these lines (Supplementary Material, Fig. S1B and C). As the fusion process takes place in embryonic and not in larval stages, we conclude that the defects observed in larval muscles result in part from the deleterious effects of CTG repeats on

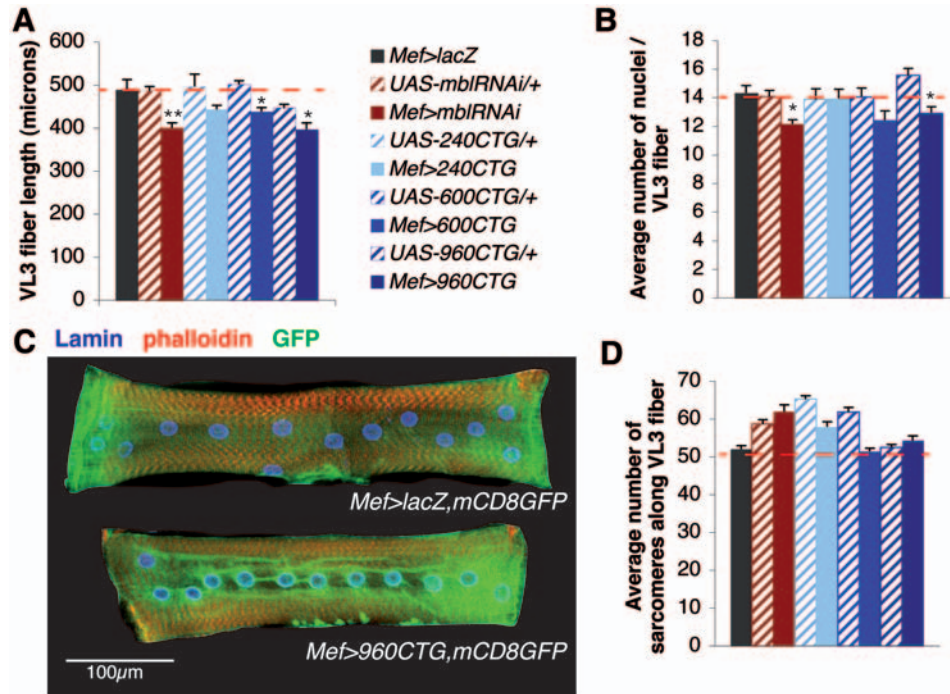


Figure 3. Reduced muscle size in DM1 larvae is due to affected myoblast fusion. (A) The average length of abdominal VL3 fibers is significantly reduced in the *Mef>mblRNAi* line together with *Mef>600CTG* and *Mef>960CTG* lines compared with controls (*Mef>lacZ* and corresponding transgenic control line). (B and C) Myoblast fusion defect in DM1 condition is Mbl-dependent. (B) The average number of nuclei per abdominal VL3 fiber is significantly reduced in *Mef>mblRNAi* and *Mef>960CTG* lines. The number of nuclei is used as an indicator of the number of fusion events during myogenesis, which means that fusion is affected in the DM1 line in a Mbl-dependent manner. (C) Images of abdominal VL3 fibers representative of control condition and DM1 condition. Nuclei were stained with an antibody against Lamin (blue), Actin was stained with phalloidin (red) Muscle fibers were detected with anti-GFP antibody (green). (D) Larval muscle growth was not affected in the DM1 context. The average number of sarcomeres along the VL3 fiber is represented for each genotype. This number determined by actin staining with phalloidin is an index of fiber growth. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus both *Mef>lacZ* and transgenic control lines.

muscles during embryonic development. We also noted that in muscles of DM1 larvae, the distribution of nuclei along the fiber was not affected (Fig. 3C and Supplementary Material, Fig. S1C).

Impaired muscle relaxation in a *Drosophila* larval model of DM1

Myotonia is the characteristic DM1 symptom observed in patients. It leads to hypercontracted muscles, which appear shorter. Interestingly, attenuation of *mbl* via RNAi or muscle-targeted CTG repeat expression in *Drosophila* larvae results in a significantly reduced length of muscles (Fig. 3A). This may also be due to either a reduced number of sarcomeres or a decreased sarcomere size. To distinguish between these two possibilities, we counted the sarcomeres and measured their size in relaxed fibers fixed in the presence of EDTA, a calcium chelator. The profile of Z-line staining with phalloidin revealed that the number of sarcomeres in VL3 fibers was similar in control lines and in DM1 lines (Fig. 3D), whereas the line attenuated for *mbl* and the DM1 lines expressing 600 and 960 CTG repeats displayed progressively significant decreased sarcomere size (Fig. 4A and B).

The reduced sarcomere size observed in DM1 larval muscles relaxed with EDTA suggested that we could observe the hypercontracted phenotype in our model at the

fiber scale. To confirm this possibility, we measured the contractility index of each line by comparing the size of fibers relaxed with EDTA with the size of contracted fibers. We observed that the contractility index was strongly affected in the line attenuated for *mbl* and in the DM1₉₆₀ line (Fig. 4C). We expected that in these two genetic contexts, fibers would not undergo efficient relaxation when treated with EDTA and thus display a particularly low contractility index. Several channels already shown to be mis-spliced in the disease, such as the chloride channel 1 (11) and possibly the Ca pump SERCA (30) could be responsible for this phenotype.

Transcriptional profiling of DM1 CTG-repeat lines and *mblRNAi* line reveals splice-independent gene deregulation

DM1-like phenotypes observed in larval muscles of generated *Drosophila* lines prompted us to use them for transcriptional profiling in an attempt to gain insight into unknown facets of DM1 pathogenesis. One important question that remained to be addressed was the contribution of splice-independent gene deregulation to the global gene expression defects in DM1.

To approach this issue, we performed microarray analyses on the following three conditions: *Mef>mblRNAi*, *Mef>600CTG* and *Mef>960CTG* versus the *Mef>lacZ* control condition. We found that among all up- and down-regulated

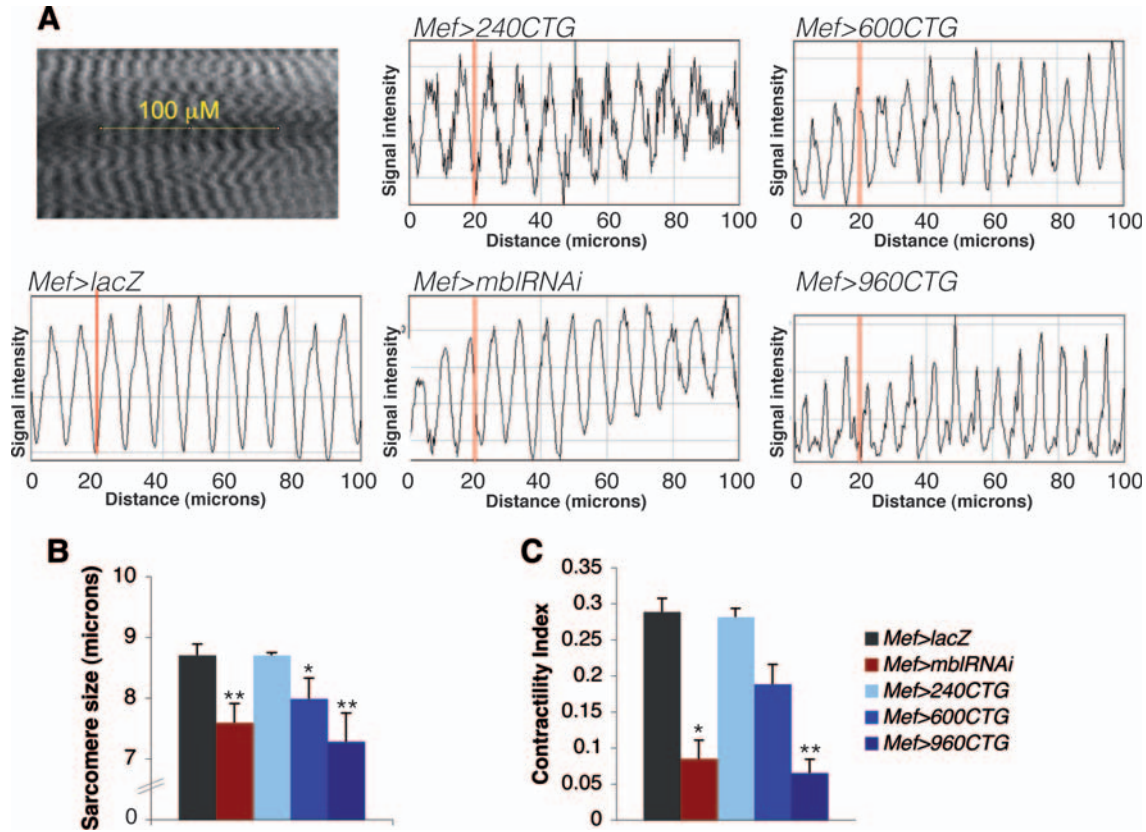


Figure 4. Muscle hypercontraction in DM1 larvae is Mbl-dependent. (A and B) Sarcomere shortening in DM1 condition is Mbl-dependent. (A) Z-band profiles along the VL3 fibers were assessed with phalloidin staining along a 100 μM length. The distance measured between the two peaks corresponds to the sarcomere size. Thus, the greater the number of peaks present on the profiles, the more contracted is the muscle. (B) For each mutant line analyzed, the average sarcomere size is represented in the graph. (C) Contractility defect observed in DM1 lines is both repeat-size-dependent and Mbl-dependent. The contractility index is the difference between the average length of VL3 fiber relaxed with EDTA and the average length of contracted VL3 fiber. For each mutant genotype, this index is normalized with the average length of VL3 fiber relaxed with EDTA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus *Mef>lacZ* line.

genes (Supplementary Material, Table S1) in *Mef>600CTG* and *Mef>960CTG* contexts, those whose expression changed in CTG repeat lines but not in the *Mef>mbIRNAi* line (Fig. 5A) represented $\sim 35\%$ (291 genes out of 833 with at least 2-fold up- or down-regulation).

Within this pool of CTG-only deregulated genes, most (69.5%) are known to produce only one transcript (Flybase, <http://flybase.org/>), suggesting the possibility that the mechanism other than splicing contributes to their regulation. Thus, our data show that Mbl-independent and more importantly, splice-independent gene deregulation can be detected in muscles expressing toxic repeats. Among candidates identified as specifically down-regulated by CTG repeats and described as producing only one transcript are genes involved in metabolic processes, in particular in carbohydrate metabolism and oxidation-reduction processes (Fig. 5B). Five genes from each category stated above were selected for validation (*Amy-d*, *Amy-p*, *CG32444*, *CG9466* and *CG9468* for the metabolism group and *Cyp6a18*, *v*, *Cyp6w1*, *Cyp304a1* and *CG2065* for the oxidation-reduction process group). All of them have human orthologs. The RT-qPCR experiments performed confirmed that all candidates were significantly misregulated in *Mef>960CTG* contexts with a down-expression for *Amy-d*, *Amy-p*, *CG32444*, *CG9466*, *CG9468*, *v*, *Cyp6w1*,

Cyp304a1 and *CG2065* and an up-regulation for *Cyp6a18* (Fig. 5C and D). We also found that *Amy-p*, *Cyp304a1* and *CG2065* were actually down-regulated to a lesser extent in *Mef>mbIRNAi* larvae, highlighting higher sensitivity of RT-qPCR compared with microarrays, and revealing a potential role of Mbl in indirectly regulating transcriptional activity of genes. We also observed that *CG9466* and *CG9468* down-regulations were Mbl-dependent.

A global view of repeat-size-dependent gene deregulation

Interestingly, in the validation experiments presented above, we observed that expression of *Amy-d*, *CG32444*, *CG9466*, *CG9468* and *Cyp6w1* was more strongly affected in the DM1₉₆₀ line than in the DM1₆₀₀ line (Fig. 5C and D and Supplementary Material, Table S3a). This prompted us to classify identified candidate genes with a more stringent fold-change threshold (2.3) to determine whether some biological processes are sorted out as being affected in a repeat-size-dependent manner (Fig. 5E and F). We assigned misregulated candidates to three groups: DM1₆₀₀-specific genes, DM1₉₆₀-specific genes and common DM1 genes. We note (i) that more genes were deregulated in the DM1₉₆₀ condition than in the DM1₆₀₀ line (Fig. 5E) and (ii) that they were most

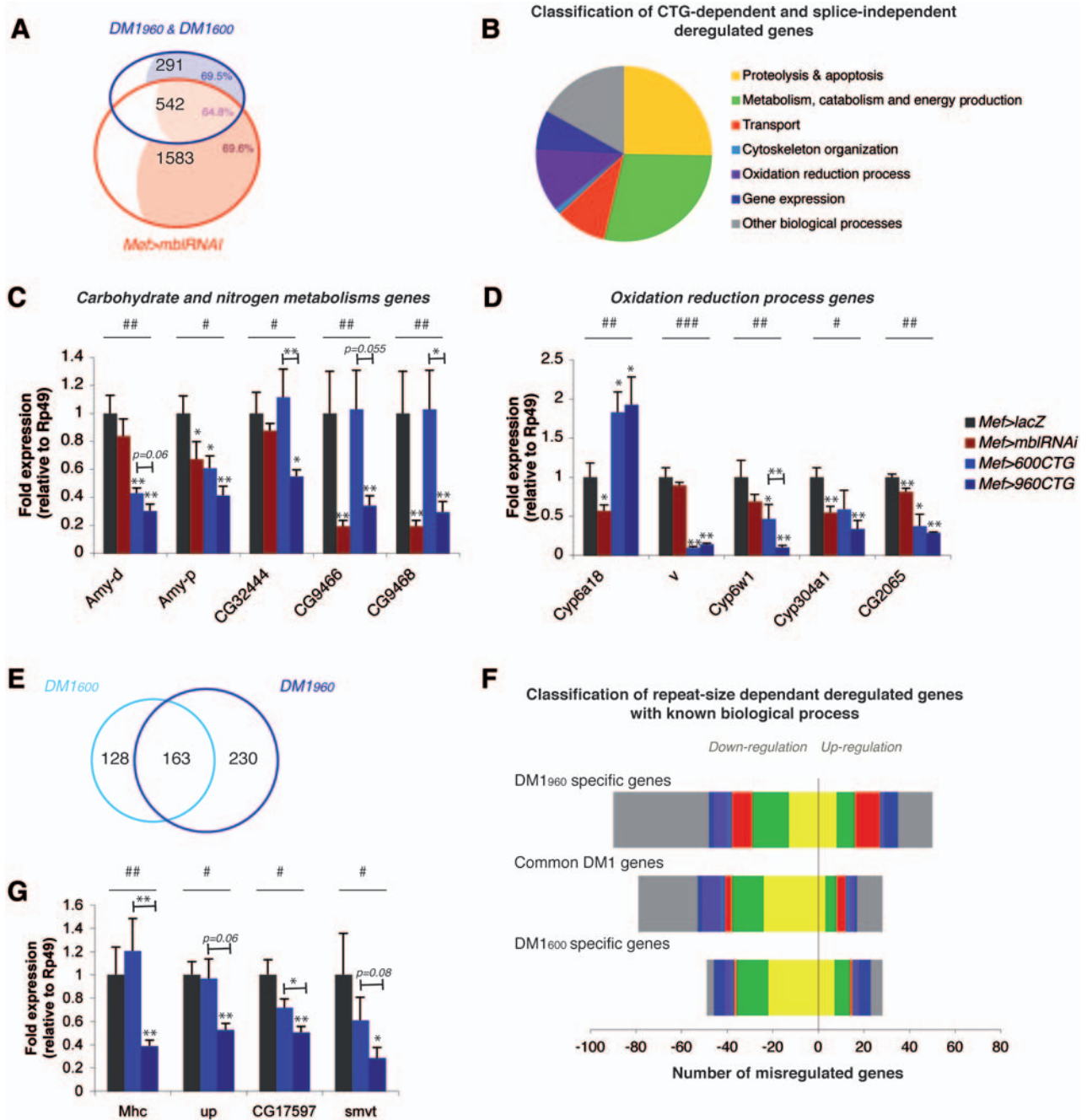


Figure 5. A global view of splice-independent and repeat-size-dependent gene deregulation in a *Drosophila* larval model of DM1. (A) Venn diagram showing transcript distribution between *Mef>mbiRNAi* context and DM1 conditions. The diagram was generated from lists of transcripts that are >2.0-fold enriched or depleted, relative to the *Mef>lacZ* reference. For each compartment, the colored area represents the enrichment in single transcripts. (B) Pie chart recapitulating the Gene Ontology based biological process distribution of CTG-dependent and splice-independent mis-expressed genes on microarrays. Genes with an unknown biological process and molecular function were not taken into account in this chart ($n = 95$). (C and D) Validation of some candidate genes by RT-qPCR among CTG-dependent and splice-independent genes. (C) *Amy-d*, *Amy-p*, *CG9466* and *CG9468* belong to the carbohydrate metabolism group, whereas *CG32444* is involved in nitrogen metabolism. All are down-regulated in microarray data. (D) *Cyp6a18*, *v*, *Cyp6w1*, *Cyp304a1*, *CG2065* are genes involved in oxidation-reduction processes. All are down-regulated on microarray data apart from *Cyp6a18* which is up-regulated. (E) Venn diagram showing transcript distribution between *Mef>600CTG* larvae (*DM1₆₀₀*) and *Mef>960CTG* larvae (*DM1₉₆₀*). The diagrams are generated from the lists of transcripts that were >2.3-fold enriched or depleted, relative to the *Mef>lacZ* reference. (F) Classification of repeat-size-dependent deregulated genes according to Gene Ontology. For each sub-group (*DM1₉₆₀* specific, *DM1₆₀₀* specific and common DM1 genes), classification takes into account up- and down-regulated genes. Genes with an unknown biological process and molecular function were not taken into account (*DM1₉₆₀* specific $n = 92$; *DM1₆₀₀* specific $n = 51$; common DM1 $n = 58$). The category 'Other biological processes' is enriched in genes involved in the structural constituent of chitin-based cuticle in *DM1₉₆₀* context most probably because of affected mobility and delayed emergence from medium of these third instar larvae. (G) Validation of some repeat-size-sensitive candidate genes by RT-qPCR. ## $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ indicate significant difference in data distribution between genotypes (Kruskal-Wallis ANOVA test). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ indicates significant difference versus *Mef>lacZ* (Mann-Whitney test). Bars indicate difference between *Mef>600CTG* versus *Mef>960CTG* conditions (Mann-Whitney test).

often down-regulated (Fig. 5F). Among the GO classes that were over-represented when classifying DM1₉₆₀ specific down-regulated genes, we found the ‘Transport’ class (red in Fig. 5F). We thus reasoned that by classifying candidates from the over-represented GO classes based on the ratio of their fold-change between *Mef*>600CTG and *Mef*>960CTG conditions, we should be able to rank repeat size-sensitive genes. In this ranking we prioritized candidates that had human orthologs, and we set a threshold of fold-change ratio at 1.8, sorting out 26 down-regulated genes and 17 up-regulated genes (Supplementary Material, Table S3b). As genes belonging to the ‘Transport’ GO category were over-represented among candidates down-regulated specifically in the DM1₉₆₀ condition, we picked two high-ranked and evolutionarily conserved genes (Supplementary Material, Table S3b) from this category for validation: *smvt* (*sodium-dependent multivitamin transporter*) and *CG17597* [ortholog of the human Sterol Carrier Protein-2 (*SCP-2*) gene]. RT-qPCR confirmed that both were down-regulated in a CTG repeat-size-dependent manner. However, for both of them we observed slightly reduced expression also in the DM1₆₀₀ context (Fig. 5G). We then extended our analyses to two other highly ranked genes: *Myosin Heavy Chain* (*Mhc*) and *upheld* (*up/ cTNT*) (Supplementary Material, Table S3b) whose orthologs are already known to be affected in DM1 (13,31,32). *Mhc* and *up* code for major components of sarcomeres and as shown in Fig. 5G are down-regulated specifically in the DM1₉₆₀ condition. Thus, this analysis identifies a set of genes whose deregulation is repeat-size-sensitive and can represent potential markers of disease progression.

Mp20, an indirect Mbl target involved in DM1-associated myoblast fusion defects

Among genes whose expression was altered in Mbl-only and Mbl/CTG repeat contexts were single-transcript genes (Fig. 5A and Supplementary Material, Table S4), indicating that Mbl can affect gene expression in a splice-independent way, most probably indirectly *via* mis-splicing transcription factors. Gene family distribution of both CTG and Mbl-dependent candidates, which correspond to single-transcript genes (Fig. 6A), shows that proteolysis and lipid metabolic processes are mainly affected. However, a candidate from a different category encoding an actin interacting protein caught our attention: *Muscle protein 20* (*Mp20*).

Mp20 is known to be a positive modulator of myoblast fusion (33) during embryonic myogenesis. To validate decreased expression of *Mp20* detected by microarrays, we first performed a series of RT-qPCR experiments. We found that *Mp20* expression was indeed reduced in *Mef*>*mblRNAi*, *Mef*>600CTG and in *Mef*>960CTG larvae but also in late embryos when the myoblast fusion process takes place (Fig. 6B). This finding prompted us to test whether this Mbl-dependent transcriptional down-regulation of *Mp20* contributed to the affected myoblast fusion resulting in a reduced number of nuclei in larval muscles. We compensated for the reduced transcript levels of *Mp20* by targeting *Mp20* transgene expression to embryonic and larval muscles of *mblRNAi* and DM1 lines. The experiment performed showed that *Mp20* was able to rescue DM1-associated fusion

phenotypes (Fig. 6C and D), reestablishing wild type-like numbers of nuclei.

In silico prediction of Mbl targets and microarray analyses identify transmembrane isoform of the *Drosophila* sarco endoplasmic reticulum calcium-ATPase (dSERCA) as required for proper muscle contraction in DM1

To further investigate the involvement of Mbl in DM1, we sought to predict its mRNA targets using the YGCU(Y)nGCY consensus motif generated from sequences reported as bound by Mbl (34–36). We then searched for this motif in all intronic sequences of *Drosophila* genes referenced as alternatively spliced in the Flybase database and having a human ortholog. This led us to identify 1314 genes that could potentially be targeted by Mbl (Supplementary Material, Table S5). This pool of *in silico* Mbl target genes producing transcripts that undergo alternative splicing was compared with splicing-dependent genes whose transcript level is altered in *Mef*>*mblRNAi* larvae. In all, 112 candidates were sorted out as common *in silico*/microarray Mbl targets (Fig. 7A, Supplementary Material, Table S6), among them (Fig. 7B) the pump and transporter category.

As shown previously, both DM1 lines and the *mbl* attenuated line exhibited altered contractility (Fig. 4C), which could be due to a transcriptional deregulation or mis-splicing of calcium channels and/or chloride channels. Interestingly, among the common *in silico*/microarray Mbl targets identified we found *dSERCA* encoding a calcium pump. Since *in silico* prediction sorted out *dSERCA* as a target of the Mbl splicing factor and microarray data revealed differential expression of only a subset of *dSERCA* probes, it seems likely that *dSERCA* transcripts could be mis-spliced in DM1 muscles as already observed for *SERCA1* in patients’ muscles (30). More precisely, the position of differentially expressed microarray probes suggests that the isoforms containing exon 8 or 11, encoding a sequence for the putative transmembrane domain (according to prosite scan software), could be down-regulated. In order to confirm that *dSERCA* was mis-spliced, we performed an RT-qPCR with a set of primers designed to specifically recognize the exons (8 or 11) coding for the transmembrane domain, and another set of primers designed to target the exons specific to the isoform A (exons 13 and 14) which does not contain this putative transmembrane domain (Fig. 7C). In normal conditions, we found that the transmembrane isoform was predominantly expressed (Fig. 7D). However, under pathological conditions, we observed a decreased expression of transcripts containing the transmembrane domain and an increased expression of transcripts coding for the isoform A (Fig. 7D). dSERCA expression in larval muscles was assessed by immunostaining and showed reduced or absent dSERCA expression at muscle surface in the DM1₉₆₀ line and *mbl* attenuated line (Fig. 7E), but also in sarcomere for *Mef*>*mblRNAi* larvae in which dSERCA expression was more strongly affected. In addition, DM1 lines exhibited ectopic expression of dSERCA in nuclei. Thus *dSERCA* was mis-spliced in DM1 lines as well as in line attenuated for *mbl*, indicating that Mbl contributes to the mis-splicing. The accumulation in the nuclei of dSERCA in these lines (Fig. 7E) may correspond to an accumulation of dSERCA-A proteins.

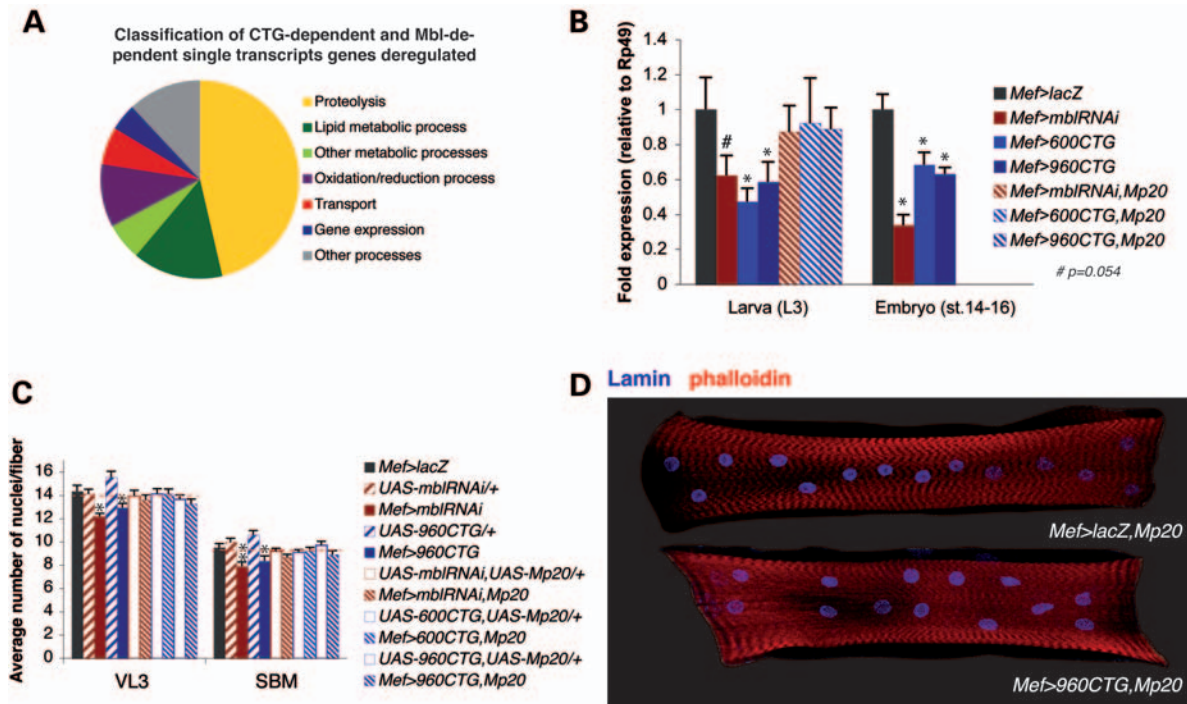


Figure 6. *Mp20*, a novel Mbl regulated single-transcript gene is able to rescue DM1-associated myoblast fusion defect. (A) Classification of CTG-dependent, Mbl-dependent and splice-independent deregulated genes according to Gene Ontology. Genes with an unknown biological process and molecular function were removed. *Muscle protein 20* (*Mp20*), which regulates myoblast fusion, was identified in the 'other' group. (B) Validation of *Mp20* decreased expression at larval stage by RT-qPCR and during muscle differentiation (late embryo). * $P < 0.05$ indicates significant difference versus *Mef>lacZ* (Mann-Whitney test). (C and D) Rescue experiment of myoblast fusion defect. (C) Average number of nuclei in VL3 and SBM fibers of mutant third instar larvae overexpressing *Mp20*. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus both *Mef>lacZ* and transgenic control lines (ANOVA). (D) Images of rescued abdominal VL3 fibers representative of control condition (*Mef>lacZ, Mp20*) and DM1 condition (*Mef>960CTG, Mp20*). Nuclei were stained with antibody against Lamin (blue) and muscles were stained with phalloidin (red).

As previously mentioned, dSERCA could be involved in DM1 hypercontracted phenotype. In order to validate this hypothesis, we first tested the effect of cyclopiazonic acid (CPA), a specific SERCA inhibitor (37), on the contractility index of the control line and hypercontracted lines. The *Mef>lacZ* control line exhibits an altered contractility index in the presence of CPA (Fig. 8A), showing that dSERCA inhibition can affect the contractility index. In addition, already hypercontracted lines, *Mef>960CTG* and *Mef>mbIRNAi*, did not display any additive effect of CPA on their altered contractility index, suggesting that dSERCA is indeed an effector of hypercontraction in these lines. In order to rescue hypercontraction in DM1 and *mbl* attenuated contexts, we generated an inducible line that overexpressed the dSERCA transmembrane isoform and crossed it with hypercontracted mutant lines. Immunostaining showed that dSERCA expression was re-established at the muscle surface in both contexts, making it difficult to discern sarcomeres (Fig. 8B). Also, the contractility index was totally rescued in both *Mef>960CTG, dSERCA_mb* and *Mef>mbIRNAi, dSERCA_mb* lines (Fig. 8A).

DISCUSSION

Drosophila has already proved to be a powerful tool for conducting genetic screening and global analyses on the effect of CTG repeats in DM1 (21,22,38). So far, an inducible line

expressing 480 interrupted CTG repeats has been used at the adult stage and shows age-dependent muscle degeneration (18). In this study, we generated a set of three inducible site-specific lines expressing 240, 600 or 960 interrupted CTG repeats. It has been observed in some cases of DM1 the existence of variant repeats interrupting the pure CTG expansions (39–41). Interestingly, interruptions allowed either repeat stabilization (39,40) or repeats contraction (41). If in one peculiar DM1 family CCG and CGG variants were associated with Charcot-Marie-Tooth symptoms (40), the role of interruptions remains unclear in other patients (41). The interrupted CTG repeats have already been used to generate different animal models of DM1 (21,42) including ours. One could consider a possibility of additive toxic effect in all these models. However, the CTCGA interruption motif commonly used for these models (21,42) is different from already described variants and its toxicity as well as instability were not reported so far.

We used CTG size variation to compensate for age effect in third instar larvae. Here, larval muscles were studied instead of adult muscle for three reasons: (i) segmentally repeated larval musculature is organized in a stereotyped network of muscle fibers and is easy to analyze at morphological and functional levels, (ii) establishing and characterizing larval DM1 model appeared attractive for future genetic rescue approaches and molecular screening applications and (iii) adult lethality of

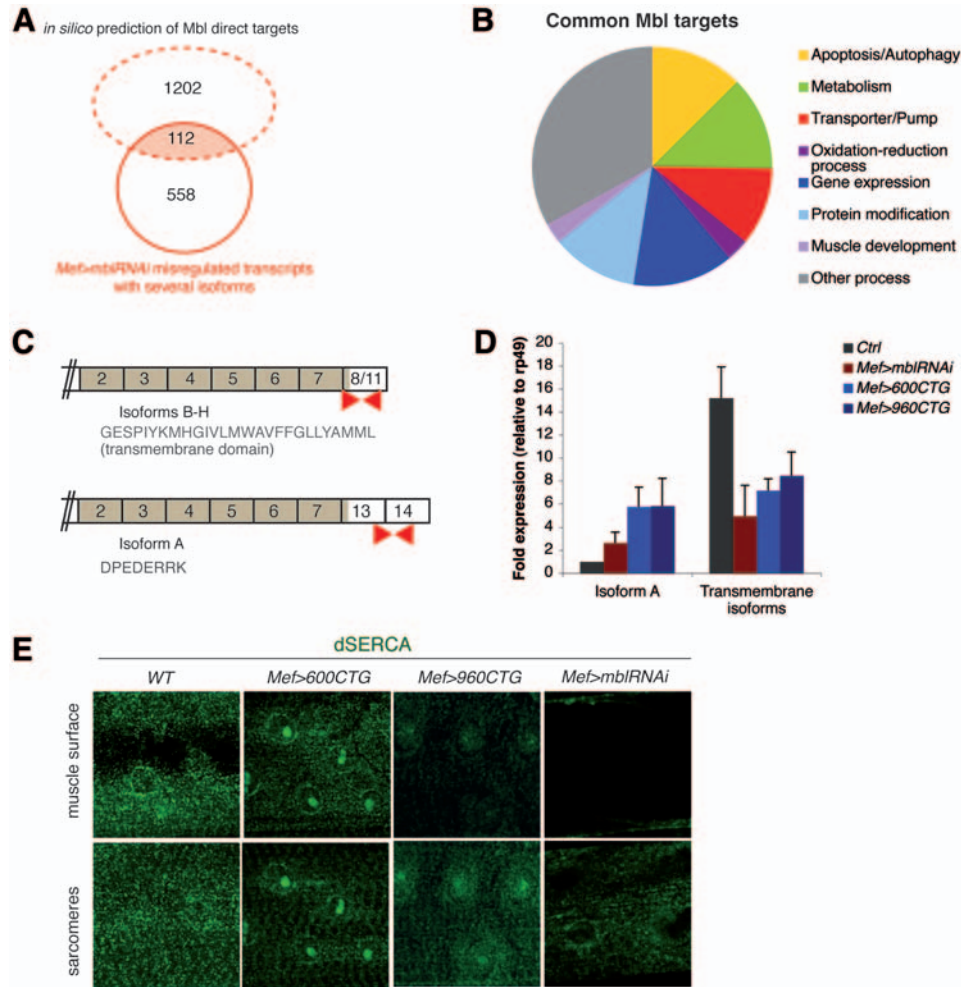


Figure 7. *In silico* prediction of Mbl targets associated with transcriptomic analysis allowed identification of mis-splicing of *dSERCA* in a *Drosophila* larval model of DM1. (A) Venn diagram showing transcript distribution between Mbl predicted spliced targets and *Mef>mbIRNAi* misexpressed transcripts with several isoforms. The diagram was generated from a list of transcripts with several isoforms that were >2.0-fold enriched or depleted relative to the *Mef>lacZ* reference and a list of transcripts with several isoforms that had the YGCUYnGCY motif in intronic sequences. (B) Pie chart recapitulating the Gene Ontology-based biological process distribution of genes with several isoforms both predicted and misregulated on *Mef>mbIRNAi* arrays. Genes with an unknown biological process and molecular function were removed ($n = 9$). (C and D) *dSERCA* mis-splicing in DM1 lines was Mbl-dependent. (C) *dSERCA* transcript has two spliced isoforms represented in the scheme that differ by their C-terminal domain for which the protein sequence is shown in gray. (D) RT-qPCRs performed with primers specific to *dSERCA* isoform A or *dSERCA* with transmembrane domain (red arrowhead) demonstrate that the isoform A with an unknown C-terminal motif is significantly less expressed as shown by RT-qPCR than the isoforms B-H with a putative transmembrane domain. In DM1 condition and *Mef>mbIRNAi* condition, the quantity of isoforms with a transmembrane domain is decreased, whereas the level of isoform A is increased. (E) Fluorescent immunostaining of larval muscles with *dSERCA* antibody (green). Given the difficulty of seeing sarcomere staining in the WT condition due to muscle surface staining, the stack was split into two. One stack is the muscle surface and the other one, which is deeper, shows sarcomeres.

the *Mef>mbIRNAi* line prevented comparative analyses with DM1 lines in adult flies.

Drosophila larval model recapitulates main DM1 muscle defects observed in patients and vertebrate models

As observed in patients, we found that expressing an increasing number of CTG repeats in larval somatic muscles led to the formation of nuclear foci (5,6) and that these foci co-localized with *Drosophila* MBNL1 ortholog, Mbl (7). As the number of repeats positively influences the number of foci per nucleus and worsen muscle phenotypes, we consider that the new *Drosophila* model of DM1 presented here is of interest for simulating disease progression and (or) severity.

Global analysis of muscle pattern in our model revealed a histopathological defect called ‘splitting fibers’ already observed in *mbnl1* knockout mice (43) as well as in DM1 patients (23,24). Here, splitting occurs during larval stages characterized by rapid muscle growth. As observed in dorsal oblique fibers, it is initiated at muscle endings at the level of interaction with tendon cells. This suggests that splitting results from affected muscle attachment to tendon cells and (or) abnormal sarcomeric organization that weaken the integrity of myofibrils. This latter hypothesis is supported by decreased expression of two sarcomere components (Mhc, up) in the DM1₉₆₀ line. Surprisingly, the *Mef>240CTG* line which did not exhibit visible foci within muscle nuclei displayed altered motility associated with muscle splitting but

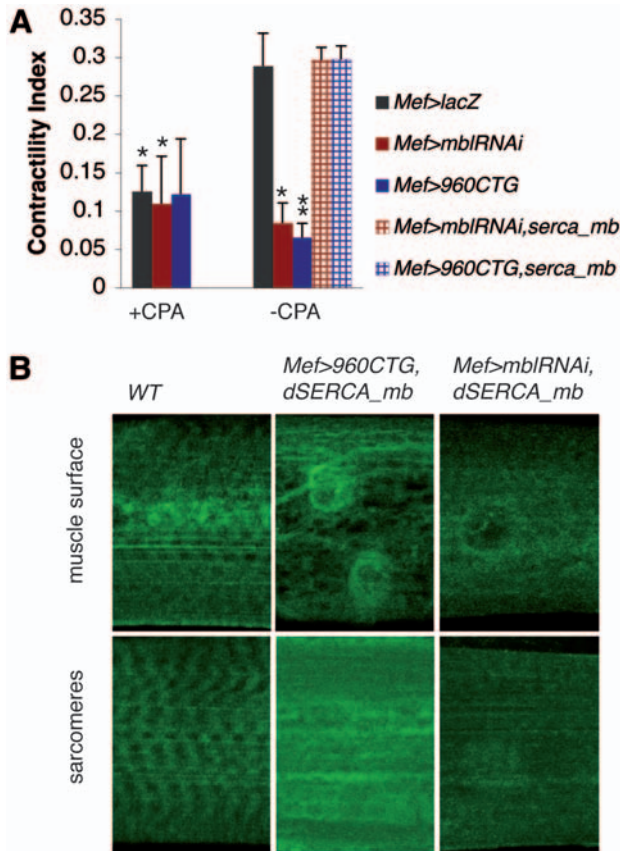


Figure 8. Involvement of dSERCA in muscle hypercontraction phenotypes. (A) Hypercontraction observed in DM1₉₆₀ line and *mbI* attenuated line can be reproduced by dSERCA inhibition by cyclopiazonic acid (CPA). Contractility index in the presence of CPA is the difference between the average length of the VL3 fiber in the presence of 25 μ M CPA and 25 mM EDTA and the average length of the contracted VL3 fiber. For each mutant genotype, this index is normalized with the average length of VL3 fiber relaxed with EDTA only. Contractility index is rescued in lines overexpressing dSERCA transmembrane isoform dissected in the absence of CPA. (B) Fluorescent immunostaining of larval muscles with dSERCA antibody (green) in rescue lines. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus *Mef>lacZ* (-CPA) line.

no fiber defects. This observation suggests that splitting is sufficient to alter motility.

Also, SBM and VL3 fiber examination shows reduced muscle size. So far, it has been shown in primary cell culture of myoblasts from DM1 patients that the ability of DM1-derived myoblasts to fuse is affected (29), consequently reducing myotube length. Here, we report for the first time that expressing non-coding CTG repeats affects *in vivo* myoblast fusion. Interestingly, microarray data and RT-qPCR performed at embryonic and larval stages on mutant lines have shown decreased expression of *Mp20* encoding an actin-binding protein involved in *Drosophila* myoblast fusion (33). *Mp20* appears as an attractive candidate gene for myoblast fusion defects in DM1, since by overexpressing *Mp20* during myogenesis we were able to rescue the number of nuclei per fiber in our DM1 lines and in the *mbI* attenuated line. Surprisingly, *Mp20* did not appear to undergo alternative splicing (single-transcript gene according to Flybase), suggesting that its Mbl-dependent down-regulation could occur

through an indirect effect of Mbl. It is also noteworthy that one human counterpart of *Mp20*, the Calponin 3 gene, has recently been found involved in myoblast fusion *in vitro* (44). Thus, genes of the *Mp20*/Calponin family appear as attractive candidates to be tested for their role in DM1 muscle defects in humans.

Finally, we report here that mutant larvae and in particular those from DM1₉₆₀ and *mbI* attenuated lines display altered motility with affected complex movements. Interestingly, by measuring the contractility index and sarcomere size, we found that both the lines exhibited hypercontraction, a phenotype related to myotonia. It was previously shown that *mbn11* disruption in the mouse also leads to myotonia (43). In our *Drosophila* DM1 model, we observed the effect of CTG repeat size on the severity of myotonia, so that the DM1₆₀₀ line exhibits intermediate hypercontraction phenotypes when compared with DM1₂₄₀ and DM1₉₆₀. As not only hypercontraction but also affected myoblast fusion account for a reduced muscle size in pathological lines, we assume that both parameters need to be repaired to fully rescue muscle length.

Genome-wide view of repeat-size-dependent gene deregulation in *Drosophila* DM1 model

As demonstrated here, the severity of several phenotypes is positively correlated with the size of the CTG repeats. This prompted us to carry out comparative transcriptional profiling on DM1₆₀₀ and DM1₉₆₀ lines. First, during validation of selected candidate genes from microarray analyses we identified repeat-size-dependent deregulation of genes involved in carbohydrate and nitrogen metabolism. A more systematic classification of candidates deregulated in a repeat-size-dependent manner and having human orthologs was then performed based on the ratio of their fold-change between the two conditions and on their function. Our data revealed that genes encoding transporter proteins were significantly enriched among gene categories down-regulated in larvae carrying high repeat numbers (DM1₉₆₀ line).

Among these we validated repeat-size-dependent deregulation of *smvt* whose human orthologs (*SLC5A3*, *SLC5A5*, *SLC5A8* and *SLC5A12*) encode *myo*-inositol transporters and *CG17597/SCP-2* involved in phosphatidylinositol transfer and signaling (45). It is known that phosphatidylinositol is a derivative of *myo*-inositol, suggesting that both transporters may work in the same pathway. However, how the alterations of transporters influence the accumulation of the inositol forms and how this is connected to muscle defects observed in our DM1 model remain to be investigated.

We also found that two genes involved in the sarcomere structure *Mhc* and *up* were both down-regulated specifically in the DM1₉₆₀ context. In DM1 patients, it was shown that *Mhc* ortholog *MYH14* (31) and *up* orthologs *TNNT2* and *TNNT3* (13,32,43) were mis-spliced. Besides, a recent report provided evidence that in a *Drosophila mbl* null mutant, *up* transcripts are mis-spliced as well (46). However, the link between the *Mhc* and *up* gene deregulations and DM1 muscle phenotypes and their impact on DM1 pathogenesis have not yet been investigated. We speculate that down-regulation of *Mhc* and *up* might be involved in splitting fiber phenotype observed in DM1 larvae.

Table 1. Transcription factors potentially targeted by Mbl (*in silico* and i-cisTarget approaches)

Transcription factors	Fold change			Total number of potential targets
	<i>Mef</i> > <i>MblRNAi</i> versus <i>Mef</i> > <i>lacZ</i>	<i>Mef</i> > <i>600CTG</i> versus <i>Mef</i> > <i>lacZ</i>	<i>Mef</i> > <i>960CTG</i> versus <i>Mef</i> > <i>lacZ</i>	
<i>pnr</i> ^a	19.8006878 20.72330305	4.301325137 4.418375037	7.735258251 8.133633527	2 UP and DOWN, 53 UP, 161 DOWN
<i>Srp</i>	19.23811668 21.86058558	5.320132712 4.951556529	8.043820951 7.898823935	
<i>grn</i> ^a	6.50629721	2.290938165	1.662407288	
GATAd	2.526686865 3.064238387 3.913588264	1.913553473 2.101051949 2.464002162	1.413056439 1.697918794 2.701223076	
GATAe	1.09052134 1.566326296 1.473393973	1.404893738 0.960974798 1.000185731	1.578942989 1.019932997 0.979883611	
<i>Grh</i>	0.296620007 0.285332972 2.785286895 2.77198952	0.958615646 1.04485069 2.05870268 1.991924598	1.373793422 1.397218504 1.351880094 1.338593392	161 UP 79 DOWN
<i>dMef2</i> ^a	9.501076134 3.626729594 3.25854362 0.822792283 0.754109009 12.06694251 11.16057435	4.115819568 2.103989232 1.653367276 1.122871091 0.912627454 4.860350606 4.449885672	5.491073284 1.902840071 1.589423834 0.649758351 0.903585877 5.038641324 4.448019752	7 UP 29DOWN (among which <i>Mp20</i>)
<i>Ubx</i> ^a	0.839335768 9.531774283	1.057993959 4.336248617	0.89748296 6.301056487	13 UP
<i>ap</i> ^a	2.635509077 7.011986678 2.883751818 3.016835229	1.808776213 3.303808873 1.888507613 1.837910836	1.892875924 5.125301349 3.159845992 3.359790658	
<i>Antp</i> ^a	1.771863767 1.520081576 1.450172648 1.665172887 1.990104138 2.403039051 2.96173272	1.952394639 2.876022565 1.225423142 1.557529125 0.865949392 0.957835889 1.55515405	2.313346169 2.704373327 1.767095346 1.301729041 0.538803684 0.588120273 0.98788029	6 UP

All the transcription factors were identified by analyzing single-transcript genes from the list of Mbl-dependent candidates using the i-cisTarget software (<http://med.kuleuven.be/lcb/cisTargetX2%22>). For each one, the fold change in the microarray experiment for different probes in each condition is shown as the number of putative targets.

^aIndicates transcription factors sorted out by *in silico* prediction.

Comparative genomics of CTG repeat lines and *mblRNAi* line identify splice-independent gene deregulation in DM1

Comparative genomic analyses showed that a high percentage of genes with misregulated expression (~70%) did not undergo alternative splicing but were sorted out in the *Mef*>*mblRNAi* context. As Mbl binds specifically to double-stranded RNA structures (36), we hypothesize that it may influence transcript stability of this class of genes as already observed with MBNL1 in C2C12 cells (47). Alternatively, Mbl might play an indirect role on single-transcript genes via mis-splicing of transcription factors that regulate their expression. In order to gain insights into the second hypothesis, we tried to identify potential common regulators of Mbl-deregulated single-transcript genes using the bioinformatics

i-cisTarget (<http://med.kuleuven.be/lcb/cisTargetX2%22>) approach (48). Interestingly, several transcription factors known to act in muscles (Table 1) such as *dMef2* and GATA factor Panier (*Pnr*) were found as potential transcriptional regulators of candidate genes. More importantly, the same transcription factors were found deregulated in transcriptional profiling experiments under all pathological conditions and most of them (including *dMef2* and *Pnr*) were also predicted *in silico* to be targets of Mbl. Thus, these data reveal an important contribution of single-transcript gene deregulation in our *Drosophila* DM1 model and point to an indirect role of Mbl in the regulation of gene expression via mis-splicing of key myogenic factors. As a matter of fact, this mechanism may play a role in the regulation of *Mp20* expression, one of *dMef2* targets (Table 1). Interestingly, both qPCR and microarray experiments showed that *Mp20*

expression is down-regulated in pathological contexts leading to myoblast fusion defects. Consequently, we suggest an indirect role of Mbl in *Mp20* expression through misregulation of *dMef2* alternative splicing.

Combined *in silico* prediction of Mbl splice targets and transcriptional profiling of *mbIRNAi* line reveal a key role of dSERCA in DM1-associated muscle contraction defect

As discussed before, we observed in DM1₉₆₀ larvae an Mbl-dependent muscle hypercontraction phenotype related to myotonia. By associating microarray data with *in silico* prediction of Mbl direct targets, we identified *dSERCA* gene as a putative candidate for Mbl-driven mis-splicing and hypercontraction phenotype. We confirmed by an RT-qPCR that the isoforms B-H of *dSERCA* containing exons 8 or 11 encoding the transmembrane domain showed decreased expression in *mbl* attenuated and in DM1₉₆₀ lines. This indicates that in the Mbl-deficient context, the exons 8 or 11 of *dSERCA* were spliced out, leading to the production of dSERCA isoforms devoid of the transmembrane domain. This switch in dSERCA isoforms is consistent with the immunostaining of DM1 larval muscles, in which the membrane-associated dSERCA protein was barely detectable at muscle surface or even in sarcomere for the *Mef*>*mbIRNAi* line, whereas the level of free dSERCA in nuclei appeared to be enhanced in DM1 lines. It was previously shown that in DM1 patient muscles, as a result of MBNL1 sequestration, *SERCA1* exon 22 in the 3' part of the transcript is excluded (30,49) leading to the formation of a neonatal isoform of *SERCA1*. This isoform was expected to cause muscle degeneration, but so far, no functional analysis has been performed to confirm this hypothesis. However, patients with Brody's disease, which is caused by different mutations in the *SERCA1a* gene, manifest impairment of skeletal muscle relaxation among other symptoms (50,51). In addition, it has been shown that dSERCA plays a key role in muscle contraction and heartbeat frequency and rhythmicity in flies (52,53), suggesting that it might be involved in muscle hypercontraction phenotypes and myotonia in DM1 muscles.

To date, the only gene functionally implicated in myotonia in DM1 is the *CIC-1* encoding a muscle-specific chloride channel. *CIC-1* transcripts were found to undergo MBNL1- and CUGBP1-dependent splice modifications causing muscle delayed relaxation and pathogenic muscle defects (9,11). However, recent analyses performed on *HSA(LR)* myotonic mice have revealed that CIC-1 channels account for muscle hyperexcitability in young but not in old DM1 animals, suggesting alteration of conductance other than chloride currents (54). Thus, we decided to test whether the loss of dSERCA function and in particular depletion in its isoforms carrying the transmembrane domain could indeed affect muscle contractility. We first used a pharmacological tool, CPA, a highly specific inhibitor of SERCA (37), which binds to the entry channel (55) and found that the contractility of CPA-treated larval muscles is severely affected. We then performed rescue experiments by overexpressing the transmembrane isoform of *dSERCA* in DM1 lines with hypercontracted phenotypes and found that the contractility index was significantly improved. Thus, our data provide the

first evidence in an animal model of DM1 that SERCA mis-splicing is involved in muscle hypercontraction.

In summary, we generated a new *Drosophila* model of DM1 and showed that Mbl-dependent mis-splicing of dSERCA caused muscle hypercontraction, the main skeletal muscle defect associated with DM1. Thus, this study supports the key role of MBNL1 sequestration in DM1 pathogenesis. On the other hand, our transcriptional profiling analyses suggest that mechanisms involving an indirect effect of Mbl account for gene deregulations and muscle phenotype in DM1. Among genes whose expression is indirectly regulated by Mbl, we identified *Mp20/calponin* and showed that it is able to rescue DM1-associated myoblast fusion defects *in vivo*. Our genome-wide data also reveal Mbl-independent and more generally splice-independent gene deregulation in pathological DM1 lines. This effect could be due to the sequestration of other factors by toxic repeats. Finally, we identified new candidate genes encoding sarcomeric proteins, *myo*-inositol transporters or involved in carbohydrate metabolism whose deregulation is repeat-size-dependent. These findings further support the complexity of DM1 and make our model a valuable tool for studying disease progression and (or) repeat-size-dependent severity.

MATERIALS AND METHODS

Transgenic *Drosophila* line generation and *Drosophila* stocks

All stocks were maintained at 25°C in standard medium in a 12:12 h light-dark cycling humidified incubator. *UAS-iCTG₂₄₀*, *UAS-iCTG₄₈₀* and *UAS-iCTG₆₀₀* plasmids were generated following published procedures (56). *UAS-CTG₉₆₀* was generated with repeats excised from a *DMPK-CAG⁹⁶⁰* plasmid (13,57). All these constructs were generated by concatamerization of synthetic double-stranded DNA oligonucleotides of 20 CTG units interrupted by the sequence CTCGA. Site-specific transgenesis (performed by the Fly Facility platform, www.fly-facility.com) was then used to generate DM1 repeat lines. The site-specific *M{vas-int.Dm}ZH-2A*, *M{3xP3-RFP.attP}ZH-86Fb* (BL#24749, Bloomington) host line was used for injections (Fly Facility, Clermont-Ferrand, France). The *UAS-Serca_{mb}* rescue construct was subcloned from *GH26644* (BDGP ESTs Collection) by amplification with high-fidelity DNA polymerase (Phusion, Biolabs), sequenced and cloned into the pUASattb transformation vector (26). The following pair of primers was used for amplification of *Serca_{mb}* sequence: 5'-atagcggccgctgaacgaagaggataacg-3' 5'-atactcgagataatgaagtggccttatgg-3'. The site-specific *PBac{y[+]-attP-3B}VK00037* (BL#9752) host line was used for injection (Fly facility, Clermont-Ferrand, France). *w¹¹¹⁸*; *P{GD13374}v28732* line referred to as *UAS-mbIRNAi* (32) line was obtained from the Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC, Vienna, Austria). The *UAS-Mp20* rescue line was a gift from Bataillé *et al.* (33). The *y[1] w[*];P{w[+mC]} = GAL4-Mef2.R}3* mentioned as *Mef-Gal4* line was ordered from the Bloomington Stock Center (BL#27390). The *Mef*>*mCD8GFP* line was a kind gift from A. Paululat.

Lethality test

Drosophila crosses were maintained at 25°C on apple juice agar plates with yeast paste. The eggs laid were counted on the first laying day and the number of L1 larvae was counted on each subsequent day. To determine embryonic lethality, the following formula was applied: % embryonic lethality = $100 - [(L1 \text{ larvae}) / (\text{embryos})] \times 100$. No more than 25 L1 larvae were then transferred and grown on apple juice agar plates with yeast paste and the number of pupae was quantified. To determine larval lethality, the following formula was applied: % larval lethality = $100 - [(pupae) / (L1 \text{ larvae})] \times 100$.

In situ hybridization and immunofluorescence staining of *Drosophila* larval muscles

Third instar larva dissections were performed as previously described (58) in 0.9% NaCl buffer with 25 mM EDTA (except in the fiber contraction assay when EDTA was not added). Larval muscles were then fixed for 10 min in 4% formaldehyde on the plate, transferred to an Eppendorf tube, rinsed three times for 5' in 1X PBS, 0.5% Tween (PBT), blocked for 20 min in 1X PBT, 20% horse serum at room temperature. Incubation with a primary antibody was performed for 2 h at room temperature with mouse monoclonal anti-Lamin C 28.26 (1:600; Hybridoma bank, Iowa, USA), rabbit anti-Mbl (1:1000; Proteogenix, Oberhausbergen, France) and rabbit anti-dSERCA (1:1000; (52)). Muscles were then washed three times for 10 min with 1X PBT and incubated with fluorescent secondary antibodies (1:300; Jackson Immuno-Research) for 1 h at room temperature and (or) with phalloidin-TRITC (1:1000; Sigma P1951) when appropriate. Larvae were mounted in Fluoromount-G anti-fade reagent (Southern Biotech) and were then analyzed using a FV300 (Olympus) confocal microscope.

In situ hybridization on larval muscles to detect foci was performed as previously described (20). Foci were imaged with a Leica SP5 confocal microscope.

Muscle measurements

Nuclei and sarcomere counting together with fiber length measurements with or without EDTA were carried out on VL3 (and SBM) fibers located in abdominal segments of larvae, under a $\times 20$ objective. At most two segments were used for each larva and for each condition 18–22 measurements were performed. The fiber contractility index (FCI) was calculated as follows: $FCI = (\text{average size of relaxed fibers} - \text{average size of contracted fibers}) / \text{average size of relaxed fibers}$. The FCI measured in the presence of 25 μM of cyclopiazonic acid (CPA) was calculated as follows: $FCI (+CPA) = (\text{average size of relaxed fibers with CPA} - \text{average size of contracted fibers}) / \text{average size of relaxed fibers}$.

Sarcomere size measurements were performed as previously described (59) on six different VL3 muscles with three measurements of 100 microns per VL3 to homogenize sarcomere size along the fiber. The size of each sarcomere corresponds to the distance between two peaks on the plot profile generated by FIJI.

Motility tests and muscle pattern assessment

Motility tests are based on already published protocols (27). The contractility assay was performed by recording the number of peristaltic contractions executed by the larva during a 30 s move on a grape medium plate. The righting assay consists in putting the larva on its back and measuring the time needed for it to revert to its crawling position. A maximum of 60 s was recorded for larvae that failed to right themselves. Each test was performed alternatively on 10–11 larvae per genotype and repeated three times per larva.

In order to visualize a global muscle pattern, larvae expressing membrane GFP in muscles were sacrificed by heating at 70°C for 30 s. A lateral view of A5 to A7 abdominal segments was imaged on 20 larvae per genotype on a confocal microscope and splitting fibers, extra and missing fibers were quantified.

RT-qPCR

Total RNA was extracted from the whole third instar larvae using a TRIzol reagent (Invitrogen) and the remaining DNA was removed using RQ1 DNase (Promega). Complementary DNA was synthesized from 5 μg RNA using a Superscript III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). A PCR was performed using *gapdh1* or *Rp49* as controls and primers used are listed in Supplementary Material, Table S7. Quantitative RT-PCRs were performed in duplicate in a final volume of 20 μl on three to six different RNA extractions using a Power SYBR Green PCR Master Mix (Roche, Applied Science), on a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Applied Science). The following LightCycler experimental-run program was used: denaturing program (95°C for 10 min), amplification and quantification program repeated 40 times (95°C for 10 s, 58°C for 10 s, 72°C for 15 s). Data were analyzed using the $\Delta\Delta C_t$ method. Owing to the small number of samples, we could not perform a parametric test since we were unable to verify data normal distribution. We opted for the non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA test to compare all groups (i.e. Control, *Mef* > *mblRNAi*, *Mef* > *600CTG* and *Mef* > *960CTG*) in order to determine whether their differences of distribution were significant. When appropriate, we then focused on comparison between control samples and samples of interest using the non-parametric Mann–Whitney test, thus confirming significant difference.

In silico prediction of Mbl targets

The putative Mbl targeted YGCUYnGCY motif was screened in the FASTA Flybase intronic database (http://flybase.org/static_pages/docs/datafiles.html) using software developed for this purpose with the Perl CGI language. Transcripts were filtered and kept when they had both several possible isoforms and a human ortholog (Biomart, Ensembl). The position and number of the screened motifs were sorted out for each transcript. Genes coding for sorted transcripts were then classified depending on their expression profile (BDGP, <http://www.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl>) and the biological process they were involved in (Flybase).

Microarray analysis

Total RNA was extracted from whole third instar larvae using TRIzol reagent (Invitrogen). Three independent RNA isolations were performed for each of four genetic contexts. The Agilent *Drosophila* gene expression microarrays were used (Agilent, G2519F, Strasbourg, France). First, Treeview (version 1.60, University of California at Berkeley) was used to assess the similarity between triplicates. Only replicates with a 70% Pearson's correlation were kept. Secondly, a $P < 0.001$ and a 2-fold increase/decrease were the thresholds to consider a probe differentially expressed. Differentially expressed genes were then classified according to the biological process they were involved in (Flybase).

Microarray data have been deposited in the ArrayExpress database with accession code E-MTAB-1469.

General statistical analysis

All statistical analyses were performed using Graph Pad Prism (GraphPad Inc, USA, version 5.02) software. Normality of the samples was assessed with the Kolmogorov-Smirnov test. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test or Dunn's multiple comparison post-test were used for statistical comparisons of each pathologic line against its respective driver control line and (or) transgenic control line. The smallest significance of both comparisons is reported on the graphs. The results are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM), with $P < 0.05$ considered as statistically significant.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Simonelig and N. Charlet for helpful comments as well as T. Cooper and A. Berglund for kindly providing plasmids.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

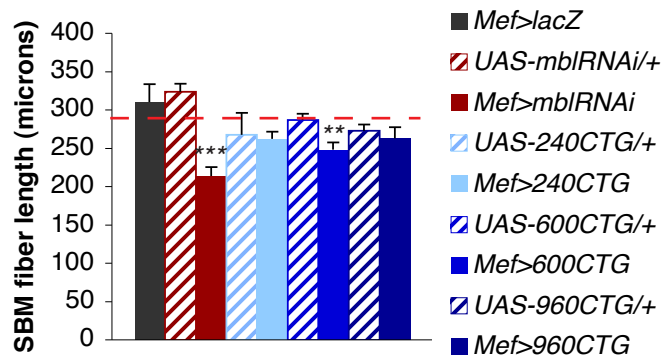
This work was supported by a European FP6 grant No. **511978** to the network of excellence Myores, by the ANR grant 'MYO-ID' (ANR-09-BLAN-0279), the Infrastructure grant TEFOR (ANR-11-INSB-0014), the FRM grant 'Equipe FRM' and AFM (15845) grants to KJ.

REFERENCES

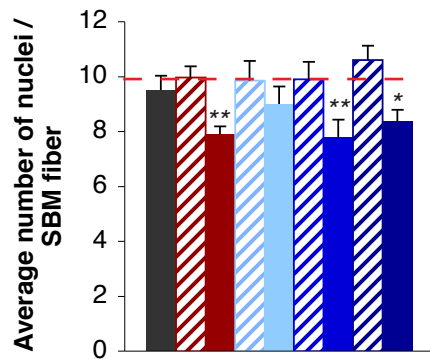
- Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V.P., Thirion, J.P., Hudson, T *et al.* (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, **69**, 385.
- Fu, Y.H., Pizzuti, A., Fenwick, R.G. Jr, King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P.W., Dubel, J., Nasser, G.A., Ashizawa, T., de Jong, P *et al.* (1992) An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science*, **255**, 1256–1258.
- Kroksmark, A.K., Ekstrom, A.B., Bjorck, E. and Tulinius, M. (2005) Myotonic dystrophy: muscle involvement in relation to disease type and size of expanded CTG-repeat sequence. *Dev. Med. Child. Neurol.*, **47**, 478–485.
- Mooers, B.H., Logue, J.S. and Berglund, J.A. (2005) The structural basis of myotonic dystrophy from the crystal structure of CUG repeats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 16626–16631.
- Taneja, K.L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D. and Singer, R.H. (1995) Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J. Cell. Biol.*, **128**, 995–1002.
- Davis, B.M., McCurrach, M.E., Taneja, K.L., Singer, R.H. and Housman, D.E. (1997) Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 7388–7393.
- Mankodi, A., Urbinati, C.R., Yuan, Q.P., Moxley, R.T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M.S. and Thornton, C.A. (2001) Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 2165–2170.
- 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.
- Kino, Y., Washizu, C., Oma, Y., Onishi, H., Nezu, Y., Sasagawa, N., Nukina, N. and Ishiura, S. (2009) MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 6477–6490.
- Savkur, R.S., Philips, A.V. and Cooper, T.A. (2001) Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.*, **29**, 40–47.
- Charlet, B.N., Savkur, R.S., Singh, G., Philips, A.V., Grice, E.A. and Cooper, T.A. (2002) Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol. Cell*, **10**, 45–53.
- Fugier, C., Klein, A.F., Hammer, C., Vassilopoulos, S., Ivarsson, Y., Toussaint, A., Tosch, V., Vignaud, A., Ferry, A., Messadeg, 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.
- Philips, A.V., Timchenko, L.T. and Cooper, T.A. (1998) Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science*, **280**, 737–741.
- 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.
- Ebralidze, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebralidse, K. and Junghans, R.P. (2004) RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science*, **303**, 383–387.
- Gourdon, G., Radvanyi, F., Lia, A.S., Duros, C., Blanche, M., Abitbol, M., Junien, C. and Hofmann-Radvanyi, H. (1997) Moderate intergenerational and somatic instability of a 55-CTG repeat in transgenic mice. *Nat. Genet.*, **15**, 190–192.
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M. and Thornton, C.A. (2000) Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science*, **289**, 1769–1773.
- de Haro, M., Al-Ramahi, I., De Gouyon, B., Ukani, L., Rosa, A., Faustino, N.A., Ashizawa, T., Cooper, T.A. and Botas, J. (2006) MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 2138–2145.
- 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.
- Houseley, J.M., Wang, Z., Brock, G.J., Soloway, J., Artero, R., Perez-Alonso, M., O'Dell, K.M. and Monckton, D.G. (2005) Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 873–883.
- Garcia-Lopez, A., Monferrer, L., Garcia-Alcover, I., Vicente-Crespo, M., Alvarez-Abril, M.C. and Artero, R.D. (2008) Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in *Drosophila*. *PLoS One*, **3**, e1595.

22. Garcia-Lopez, A., Llamusi, B., Orzaez, M., Perez-Paya, E. and Artero, R.D. (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. USA*, **108**, 11866–11871.
23. Grimby, G., Hedberg, M., Henriksson, K.G., Johansson, G., Wigerstad-Lossing, I., Sellden, U. and Orndahl, G. (1988) Muscle function and morphology in myotonic dystrophy. *Acta Med. Scand.*, **224**, 349–356.
24. Maynard, J.A., Cooper, R.R. and Ionaescu, V.V. (1977) An ultrastructure investigation of intrafusal muscle fibers in myotonic dystrophy. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.*, **373**, 1–13.
25. Bateman, J.R., Lee, A.M. and Wu, C.T. (2006) Site-specific transformation of *Drosophila* via phiC31 integrase-mediated cassette exchange. *Genetics*, **173**, 769–777.
26. Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F. and Basler, K. (2007) An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 3312–3317.
27. Mudher, A., Shepherd, D., Newman, T.A., Mildren, P., Jukes, J.P., Squire, A., Mears, A., Drummond, J.A., Berg, S., MacKay, D *et al.* (2004) GSK-3beta inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in *Drosophila*. *Mol. Psychiatry*, **9**, 522–530.
28. Furling, D., Coiffier, L., Mouly, V., Barbet, J.P., St Guily, J.L., Taneja, K., Gourdon, G., Junien, C. and Butler-Browne, G.S. (2001) Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 2079–2087.
29. Amack, J.D. and Mahadevan, M.S. (2001) The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1879–1887.
30. Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J.D., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H., Dirksen, R.T., Takahashi, M.P., Dulhunty, A.F. and Sakoda, S. (2005) Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 2189–2200.
31. Rinaldi, F., Terracciano, C., Pisani, V., Massa, R., Loro, E., Vergani, L., Di Girolamo, S., Angelini, C., Gourdon, G., Novelli, G *et al.* (2011) Aberrant splicing and expression of the nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 in DM1 muscle tissues. *Neurobiol. Dis.*, **45**, 264–271.
32. Vihola, A., Bachinski, L.L., Sirito, M., Olufemi, S.E., Hajibashi, S., Baggerly, K.A., Raheem, O., Haapasalo, H., Suominen, T., Holmlund-Hampf, J *et al.* (2010) Differences in aberrant expression and splicing of sarcomeric proteins in the myotonic dystrophies DM1 and DM2. *Acta Neuropathol.*, **119**, 465–479.
33. Bataille, L., Delon, I., Da Ponte, J.P., Brown, N.H. and Jagla, K. (2010) Downstream of identity genes: muscle-type-specific regulation of the fusion process. *Dev. Cell*, **19**, 317–328.
34. Teplova, M. and Patel, D.J. (2008) Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 1343–1351.
35. Du, H., Cline, M.S., Osborne, R.J., Tuttle, D.L., Clark, T.A., Donohue, J.P., Hall, M.P., Shiue, L., Swanson, M.S., Thornton, C.A *et al.* (2010) Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 187–193.
36. Goers, E.S., Voelker, R.B., Gates, D.P. and Berglund, J.A. (2008) RNA binding specificity of *Drosophila* muscleblind. *Biochemistry*, **47**, 7284–7294.
37. Seidler, N.W., Jona, I., Vegh, M. and Martonosi, A. (1989) Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17816–17823.
38. Fernandez-Costa, J.M., Garcia-Lopez, A., Zuniga, S., Fernandez-Pedrosa, V., Felipo-Benavent, A., Mata, M., Jaka, O., Aiastui, A., Hernandez-Torres, F., Aguado, B *et al.* (2012) Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in *Drosophila* that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 704–716.
39. Leeftang, E.P. and Arnheim, N. (1995) A novel repeat structure at the myotonic dystrophy locus in a 37 repeat allele with unexpectedly high stability. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 135–136.
40. 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.
41. 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.
42. Wang, G.S., Kearney, D.L., De Biasi, M., Taffet, G. and Cooper, T.A. (2007) Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J. Clin. Invest.*, **117**, 2802–2811.
43. Kanadia, R.N., Johnstone, K.A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C.A., Esson, D., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W. and Swanson, M.S. (2003) A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science*, **302**, 1978–1980.
44. Shibukawa, Y., Yamazaki, N., Daimon, E. and Wada, Y. (2012) Rock-dependent calponin 3 phosphorylation regulates myoblast fusion. *Exp. Cell Res.*, **319**, 633–648.
45. Schroeder, F., Zhou, M., Swaggerty, C.L., Atshaves, B.P., Petrescu, A.D., Storey, S.M., Martin, G.G., Huang, H., Helmkamp, G.M. and Ball, J.M. (2003) Sterol carrier protein-2 functions in phosphatidylinositol transfer and signaling. *Biochemistry*, **42**, 3189–3202.
46. Irion, U. (2012) *Drosophila* muscleblind codes for proteins with one and two tandem zinc finger motifs. *PLoS One*, **7**, e34248.
47. Masuda, A., Andersen, H.S., Doktor, T.K., Okamoto, T., Ito, M., Andresen, B.S. and Ohno, K. (2012) CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci. Rep.*, **2**, 209.
48. Potier, D., Atak, Z.K., Sanchez, M.N., Herrmann, C. and Aerts, S. (2012) Using cisTargetX to predict transcriptional targets and networks in *Drosophila*. *Methods Mol. Biol.*, **786**, 291–314.
49. Hino, S., Kondo, S., Sekiya, H., Saito, A., Kanemoto, S., Murakami, T., Chihara, K., Aoki, Y., Nakamori, M., Takahashi, M.P *et al.* (2007) Molecular mechanisms responsible for aberrant splicing of SERCA1 in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 2834–2843.
50. Odermatt, A., Barton, K., Khanna, V.K., Mathieu, J., Escobar, D., Kuntzer, T., Karpati, G. and MacLennan, D.H. (2000) The mutation of Pro789 to Leu reduces the activity of the fast-twitch skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA1) and is associated with Brody disease. *Hum. Genet.*, **106**, 482–491.
51. Odermatt, A., Taschner, P.E., Khanna, V.K., Busch, H.F., Karpati, G., Jablecki, C.K., Breuning, M.H. and MacLennan, D.H. (1996) Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, are associated with Brody disease. *Nat. Genet.*, **14**, 191–194.
52. Sanyal, S., Consoulas, C., Kuromi, H., Basole, A., Mukai, L., Kidokoro, Y., Krishnan, K.S. and Ramaswami, M. (2005) Analysis of conditional paralytic mutants in *Drosophila* sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase reveals novel mechanisms for regulating membrane excitability. *Genetics*, **169**, 737–750.
53. Sanyal, S., Jennings, T., Dowse, H. and Ramaswami, M. (2006) Conditional mutations in SERCA, the Sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, alter heart rate and rhythmicity in *Drosophila*. *J. Comp. Physiol. B.*, **176**, 253–263.
54. Difranco, M., Yu, C., Quinonez, M. and Vergara, J.L. (2012) Age-Dependent Chloride Channel Expression in Skeletal Muscle Fibers of Normal and Hsarl Myotonic Mice. *J. Physiol.*, **591**, 1347–1371.
55. Laursen, M., Bublitz, M., Moncoq, K., Olesen, C., Moller, J.V., Young, H.S., Nissen, P. and Morth, J.P. (2009) Cyclopiazonic acid is complexed to a divalent metal ion when bound to the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **284**, 13513–13518.
56. Fernandez-Funez, P., Nino-Rosales, M.L., de Gouyon, B., She, W.C., Luchak, J.M., Martinez, P., Turiegano, E., Benito, J., Capovilla, M., Skinner, P.J *et al.* (2000) Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature*, **408**, 101–106.
57. 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.
58. Chartier, A., Benoit, B. and Simonelig, M. (2006) A *Drosophila* model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *EMBO J.*, **25**, 2253–2262.
59. Haines, N., Seabrooke, S. and Stewart, B.A. (2007) Dystroglycan and protein O-mannosyltransferases 1 and 2 are required to maintain integrity of *Drosophila* larval muscles. *Mol. Biol. Cell.*, **18**, 4721–4730.

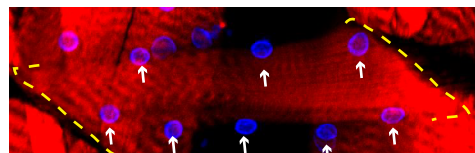
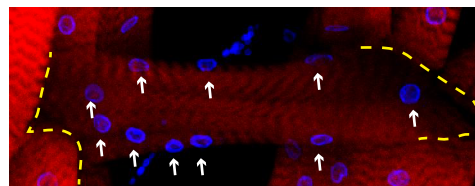
A



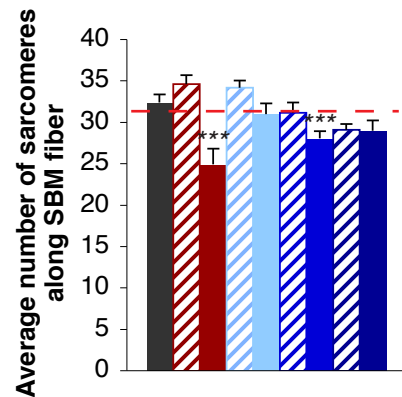
B



C



D



qPCR primers

Transcript	Fwd/Rev	5' to 3' sequence
gapdh	Fwd	accactgccaccagaagac
	Rev	cttcaggggtccctggagg
rp49	Fwd	gcttcaaggacagtatctg
	Rev	aaacgcggttctgcatgag
mbl	Fwd	cgtagggtccagaacgg
	Rev	aatatcaggcaatataaagcg
CUG non-coding transcript	Fwd	aaggaaccttacttctgtgg
	Rev	tcatcagttccataggttg
dSERCA-A	Fwd	gcagatgttctgatgtcg
	Rev	cgctctcctcacattcac
dSERCA-mb	Fwd	aacgtaacgactttaacc
	Rev	gtcaattctgtgacaccgg
Mp20	Fwd	acgagaagaaggatattgcc
	Rev	agggaccctgaagtcgg
Amy-d	Fwd	ggaccatctgattgatctcg
	Rev	ggtgttcaggttctgagg
Amy-p	Fwd	gcagtacctgaccaactgg
	Rev	attgtcgtggtgtcgacg
CG32444	Fwd	tggcgagtatacgttaacg
	Rev	ctatcgaatccaatgaagcc
CG9466	Fwd	caagttgctgaaaagtccg
	Rev	tggattgacgttcgtgacg
CG9468	Fwd	gccactgagaccttgacg
	Rev	tcgatgttctcggatactcc
Cyp6a18	Fwd	ggagcaacacgatcaaaagt
	Rev	atccacattcggtaaatgg
v	Fwd	agttgctcaccctgctcat
	Rev	ggatccaatcatgcgttc
Cyp304a1	Fwd	caataatcagggttcgatgg
	Rev	cgacgttgctcctccac
CG2065	Fwd	aggaattggaagttcctgaaa
	Rev	gctgcgtagagagtggtc
Cyp6w1	Fwd	ttgcgcacaaaaatctctcc
	Rev	gtcctgcaagttcttcaa
Mhc	Fwd	caggccatcagcaaattcc
	Rev	gtcgaatcttggtgggaa
up	Fwd	aggaacagttggaggaggag
	Rev	tgacgtttctgcctttctc
CG17597	Fwd	aagcagatcgtagagagcg
	Rev	gcgatcaaagtactttgcg
smvt	Fwd	ttttatgctgggaatgctg
	Rev	aatcacaatggtggccatac

La caractérisation des *Drosophiles* exprimant un nombre croissant de répétitions CTG dans la musculature somatique indique que ce modèle se prête bien à l'étude de la DM1. En effet, tout d'abord d'un point de vue moléculaire, nous avons pu observer que les lignées site-spécifiques *Mef>240CTG*, *Mef>600CTG* et *Mef>960CTG* expriment les ARNs non-codants à un même niveau, mais que le nombre de *foci* détectables dans les noyaux des muscles larvaires est positivement corrélé avec la taille des répétitions de trinuécléotides. Par ailleurs, nous avons vérifié que Mbl, normalement exprimé dans les noyaux des muscles larvaires est bien séquestré au niveau de ces *foci*.

Par la suite, nous avons regardé *in vivo* par microscopie confocale les défauts globaux de la musculature larvaire (Figure 2 de l'article). Nous avons vu que l'expression des répétitions non codantes ou l'atténuation de Mbl affectent la motilité des larves et induit la fragmentation longitudinale des fibres musculaires lors de leur croissance. Ces deux défauts ne nécessitent pas la formation de foci visibles par les répétitions CUG puisqu'on les retrouve dans la lignée *Mef>240CTG* bien qu'à des taux plus faibles.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux caractéristiques propres de la fibre musculaire et plus précisément des muscles VL3 (Muscle ventro-latéral 3) et SBM (Muscle de bordure de segment). Nous montrons dans la figure 3 de l'article que ces fibres sont plus courtes à cause d'un défaut de fusion des myoblastes et non de croissance dans les lignées pathologiques. C'est le premier modèle qui permet de mettre en évidence *in vivo* cette propriété observée en culture cellulaire des myoblastes de patients. Dans la figure 4, nous montrons que les lignées DM1 sont hypercontractées de manière dépendante de Mbl. Une caractéristique de la fibre apparentée à la myotonie des patients, symptôme clé de la DM1.

Nous avons réalisé des puces transcriptomiques pour les conditions *Mef>mbIRNAi*, *Mef>600CTG* et *Mef>960CTG* relativement au contrôle *Mef>lacZ*. Dans la figure 5, nous nous intéressons aux gènes dérégulés indépendamment de Mbl et ne subissant pas l'épissage alternatif. Parmi eux, nous validons la dérégulation de l'expression de quelques gènes du métabolisme des sucres et du processus d'oxido-reduction (Figure 5 C et D). Puis nous avons voulu identifier des gènes dont la dérégulation dépend de la taille des répétitions. C'est le cas de *smvt* et *CG17597*, tous deux impliqués dans le transport de dérivés de l'inositol. De même pour *Mhc* et *up* qui codent pour des constituants des sarcomères.

Dans la Figure 6 de l'article, nous nous intéressons au gène *Mp20*, gène avec un seul transcrit, dont l'expression est altérée sur les puces. *Mp20* code pour une protéine d'interaction à l'actine, exprimée dans les cellules fondatrices (FC) du muscle et impliquée dans la fusion des FCM avec le myotube en formation. C'est pour cette raison qu'après avoir observé une diminution de l'expression de *Mp20* dans l'embryon au cours de la myogénèse, nous avons tenté de restaurer le nombre de noyaux dans le VL3 et le SBM en rétablissant l'expression de *Mp20* dans le muscle des lignées pathologiques.

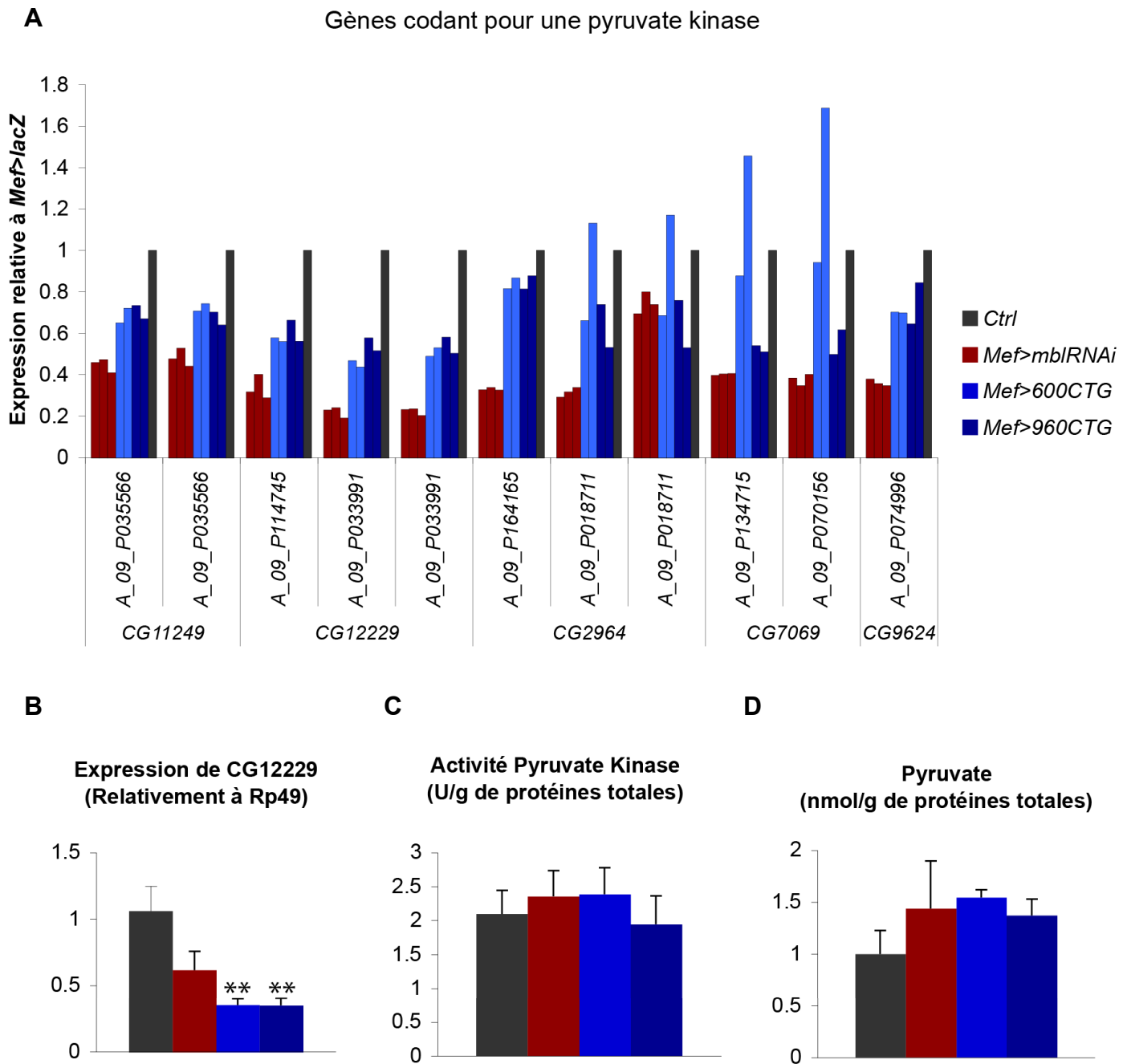


Figure 50. Implication de la glycolyse dans la DM1

A) Expression sur les puces à ADN des gènes codant pour la pyruvate kinase. Pour chaque gène, l'identifiant des sondes est indiquée ainsi que le niveau d'expression du transcrite en contexte pathologique relativement au contexte contrôle (*Mef>lacZ*). On voit une nette diminution de l'expression des gènes codant pour la pyruvate kinase pour les larves atténuées pour Mbl. B) RT-qPCR montre que l'expression de *CG12229* codant pour une pyruvate kinase est diminuée en contexte DM1. C) L'activité pyruvate kinase mesurée avec le kit Pyruvate Assay Kit (K709-100, BioVision) et rapportée à la quantité totale de protéines n'est pas altérée dans les lignées pathologiques. D) La quantité de pyruvate mesurée avec le kit Pyruvate Kinase Assay Kit (K609-100, BioVision) et rapportée à la quantité totale de protéines n'est pas altérée dans les lignées pathologiques. * $p < 0.05$ vs. Ctrl

L'analyse croisée des puces et de la recherche *in silico* des cibles de Mbl a également permis d'identifier *dSERCA* comme une cible de Mbl mal épissée (Figure 7 de l'article). Nous avons mis en évidence par qPCR que l'isoforme de *dSERCA* qui possède un domaine C-terminal codant pour un domaine transmembranaire putatif a une expression diminuée en condition pathologique. Cela se traduit par une baisse de la protéine à la surface du muscle ainsi que dans les sarcomères des lignées pathologiques. Lorsque l'on surexprime cette isoforme dans les lignées atteintes par la DM1, on rétablit une contractilité normale des fibres musculaires, ce qui suggère que l'altération de *dSERCA* intervient dans le phénotype d'hypercontraction musculaire et qu'elle pourrait être en cause dans la myotonie des patients.

Ce modèle larvaire de la DM1 reproduit un certain nombre de caractéristiques retrouvées chez les patients (défaut de fusion des myoblastes, fragmentation des muscles, hypercontraction musculaire). Ainsi il permet de visualiser l'effet de la taille des répétitions sur la sévérité des phénotypes et se prête donc bien à des analyses transcriptomiques.

3. Résultats complémentaires non publiés sur le rôle de Mbl dans le système musculaire

3.1. Rôle de Mbl dans la glycolyse du muscle larvaire

3.1.1. Résultat

Les expériences de puces à ADN ont montré que de nombreux gènes impliqués dans la voie de la glycolyse sont sous-exprimés en contexte atténué pour Mbl ou DM1 (Annexe 3). C'est le cas notamment des gènes codant pour la pyruvate kinase (Figure 50A). Je me suis intéressée au gène *CG12229* dont l'expression est diminuée dans les conditions *Mef>mbIRNAi*, *Mef>600CTG* et *Mef>960CTG* (Figure 50A). Une RT-qPCR réalisée sur des larves de stade 3 valide la diminution d'expression de *CG12229* en contexte pathologique relativement au contrôle (Figure 50B). Cependant, l'activité pyruvate kinase mesurée avec le kit Pyruvate Kinase Assay Kit (K709-100, BioVision) et rapportée à la quantité totale de protéines n'est pas altérée dans les lignées pathologiques (Figure 50C). Par ailleurs, la quantité de pyruvate de ces différents échantillons dosée à l'aide du kit Pyruvate Assay Kit (K609-100, Biovision) est identique en conditions contrôle et pathologiques (Figure 50D). L'ensemble de ces données indique que l'activité de la glycolyse est normalement maintenue malgré une diminution de l'expression de nombreux gènes codant pour les enzymes impliquées dans cette voie.

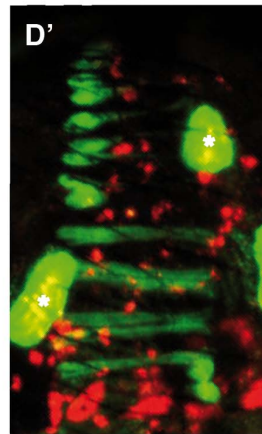
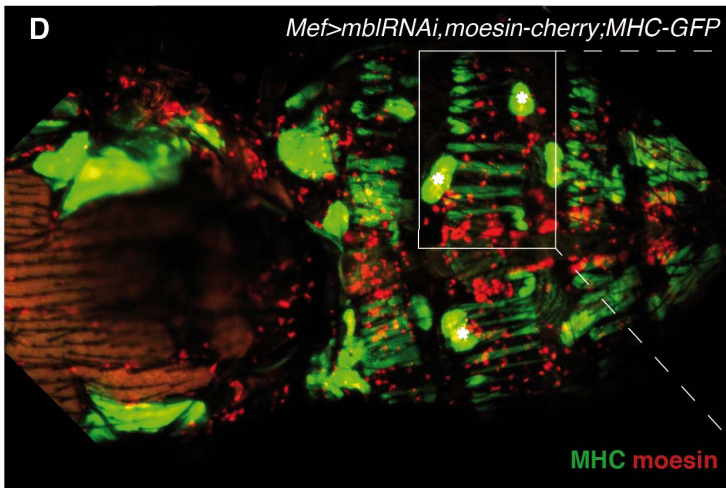
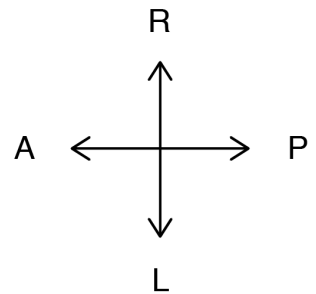
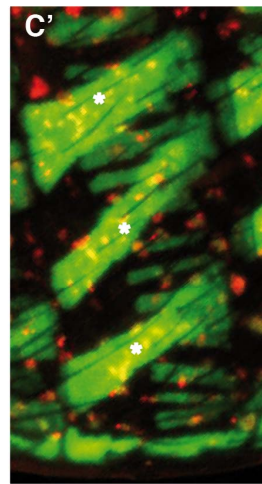
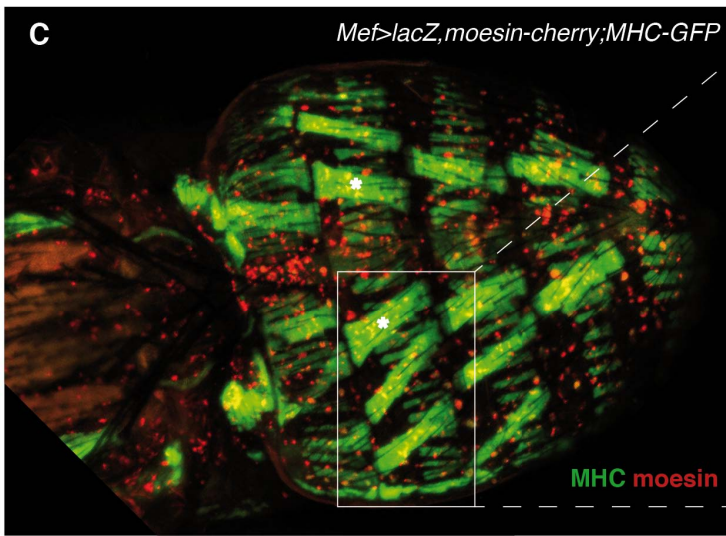
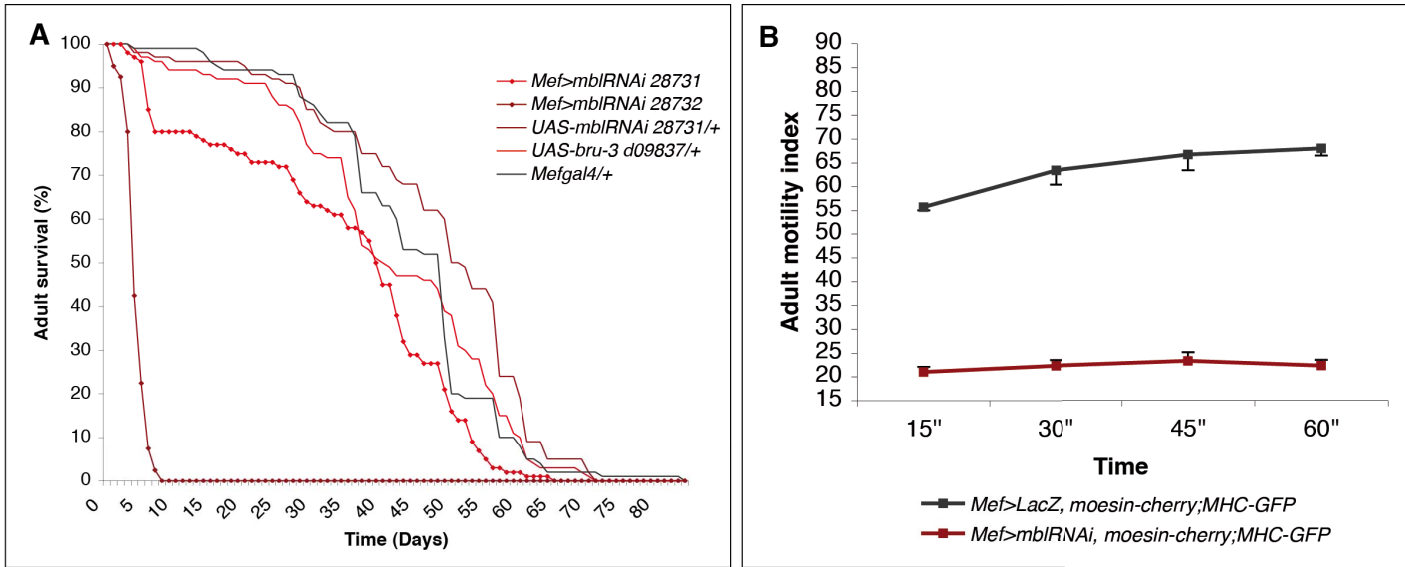


Figure 51. L'atténuation de *mbI* dans les muscles adultes diminue drastiquement la fonction musculaire et la durée de vie

A) Test de survie réalisé sur 10x10 adultes pour chaque génotype. Les mouches mortes sont comptabilisées quotidiennement. La lignée $Mef>mbIRNAi\ 28732$ a une demi-vie très brève (5 jours) comparé aux contrôles (~ 52 jours). B) L'indice de motilité des adultes évalue la capacité des mouches à grimper le long d'un tube. Cet indice est bas pour la lignée $Mef>mbIRNAi\ 28732$ ce qui indique leur difficulté à se déplacer. C-D') Muscles abdominaux d'une puppe contrôlée (C) et d'une puppe avec une atténuation de *mbI* dans les muscles (D). Magnification d'un segment abdominal de puppe contrôlée (C') et d'une puppe atténuée pour *mbI* (D'). Les muscles sont visualisés grâce à la myosine fusionnée à la GFP (vert). En rouge, les cellules individualisées expriment la moesine. L'asterisque indique les muscles larvaires persistants qui servent de matrice à la formation des muscles adultes.

3.1.2. Matériel et méthode

L'activité pyruvate kinase a été mesurée avec le kit Pyruvate Kinase Assay Kit (K709-100, BioVision). Les tests colorimétriques ont été réalisés selon les instructions du fabricant à partir de protéines extraites de 10 mg de larves de stade 3 dans 400 μ L de Assay buffer. L'activité de la pyruvate kinase a été mesurée sur les protéines diluées 25 ou 50 fois toutes les 5 min pendant 20 min à 25°C. Trois à quatre expériences individuelles ont été réalisées et les dilutions ont été testées en duplica. L'activité pyruvate kinase a été normalisée avec la quantité totale de protéines mesurée par une quantification au Bradford.

Le pyruvate a été dosé avec le kit Pyruvate Assay Kit (K609-100, BioVision). Le test colorimétrique a été réalisé à partir des protéines extraites pour mesurer l'activité pyruvate kinase et diluées 25 ou 50 fois. La quantité de pyruvate a été normalisée avec la quantité totale de protéines mesurée par une quantification au Bradford.

3.2. Importance de Mbl dans la musculature somatique adulte

L'étude phénotypique publiée sur les lignées DM1 générées dans notre laboratoire a été réalisée sur des larves de stade trois. Or, Mbl est également exprimé chez l'adulte dans les muscles somatiques et le cœur (Figure 52). Des tests de survie réalisés sur des mouches adultes ont montré que la lignée *Mef>mbIRNAi* mourrait au cours de la première semaine de vie adulte (Figure 51A). Comme seule la durée de vie de cette lignée est affectée aussi sévèrement, nous avons réalisé un test de motilité basé sur le calcul de l'indice de motilité. L'expérience consiste à attribuer un score d'autant plus élevé à une mouche qu'elle se positionne haut le long du tube à un instant t. L'indice de motilité est la somme des scores de l'ensemble des mouches d'un même génotype. Après avoir ramené les mouches au bas du tube à t=0s, j'ai quantifié aux temps 15s, 30s, 45s et 60s le nombre de mouches localisées dans chacune des zones de la paroi du tube. Comme la Figure 51B le montre, pour un nombre équivalent d'individus, les mouches atténuées pour Mbl ont un faible indice de motilité par rapport aux mouches contrôles (*Mef>lacZ*). Lorsque l'on regarde la musculature abdominale des mouches juste avant éclosion, on peut voir que les muscles larvaires persistants, indiqués par une étoile et qui servent de matrice aux muscles adultes, sont dégénérés dans la lignée *Mef>mbIRNAi* (Figure 51D et D'). Par ailleurs les muscles abdominaux adultes sont visiblement altérés au niveau de leurs extrémités. L'ensemble de ces résultats montre qu'atténuer *mbi* dans la musculature adulte est létal car affecte la structure et par conséquent la fonction musculaire.

4. Discussion

Parmi les modèles de DM1 de *Drosophile* préalablement générés (Houseley *et al.*, 2005; de Haro *et al.*, 2006; Le Mee *et al.*, 2008), un seul a pu être utilisé pour mener des cribles à grande échelle et étudier plus en détail l'effet de l'expression de répétitions CTG non codantes (de Haro *et al.*, 2006). Ce modèle en question permet d'induire l'expression de 480 répétitions CTG interrompues non codantes et a permis l'étude des muscles somatiques adultes. Afin d'enrichir le modèle et son étude nous avons voulu nous distinguer de deux manières. Tout d'abord nous avons généré un modèle avec un nombre croissant de répétitions CTG insérées spécifiquement en un point du génome. Et nous avons fait le choix de nous intéresser à d'autres muscles somatiques fonctionnels chez la *Drosophile* : les muscles larvaires.

4.1. Avantages de l'analyse de la musculature larvaire par rapport à la musculature adulte

Les muscles adultes thoracique appelés muscles de vol sont très étudiés dans les modèles de *Drosophile* de myopathie (Chartier *et al.*, 2006; Shcherbata *et al.*, 2007; Garcia-Lopez *et al.*, 2008). En effet, leur dégénérescence conduit à un phénotype bien visible, les ailes redressées, ce qui permet de mener rapidement des cribles. De plus ils permettent une étude dans le temps de la dégénérescence. Dans le cas des muscles somatiques larvaires, les cribles seraient plus contraignants même s'ils sont basés sur des tests de motilité qui ne peuvent être fait que sur un individu à la fois et qui nécessitent en plus la répétition de l'expérience. Malgré cela, le muscle larvaire ainsi que ce stade plus précoce présentent des avantages, notamment dans le cas de la DM1.

La première difficulté à laquelle nous avons été confrontés est la létalité embryonnaire tardive ou adulte précoce des lignées hypomorphes pour *mb1* ou *Mef>mb1RNAi* respectivement (Artero *et al.*, 1998). L'utilisation de l'une de ces lignées nous semblait pourtant indispensable notamment pour évaluer la contribution de la séquestration de Mbl dans les phénotypes et pour mener une étude transcriptomique comparative. Pour pallier au problème de la létalité adulte de *Mef>mb1RNAi* nous avons donc travaillé sur les stades larvaires.

Ensuite nous voulions pouvoir tester grâce au modèle larvaire deux caractéristiques de la DM1 : la myotonie et l'altération de la fusion des myoblastes observée *in vitro*. Des phénotypes d'hypercontraction musculaire avaient déjà été observés à l'échelle de l'embryon sur des mutants hypomorphes de *mb1* (Artero *et al.*, 1998), mais le muscle embryonnaire ne se prêtait pas à des mesures plus poussées. Par ailleurs le muscle embryonnaire n'a peut être pas le temps entre sa formation et l'acquisition de sa fonctionnalité de développer des phénotypes. C'est notamment le cas comme nous avons pu l'observer avec les extrémités

des fibres musculaires qui se fragmentent au cours de la croissance du muscle larvaire. De même, la fusion des myoblastes peut s'étudier sur le muscle embryonnaire (Bataille *et al.*, 2010). Cependant, d'un point de vue technique il est tout de même plus aisé de compter les noyaux qui affleurent à la surface des muscles larvaires.

4.2. Interruptions dans les répétitions CTG : stabilité mais toxicité ?

La nature de la mutation en cause dans la DM1 pose problème à plusieurs niveaux pour la génération de lignées transgéniques. D'une part, les répétitions de trinuécléotides si elles sont pures ont une taille non contrôlable par l'expérimentateur qui va varier d'une génération à l'autre, d'un individu à l'autre et d'un tissu à l'autre. Alternativement, si par facilité de construction on utilise des répétitions interrompues qui présentent l'avantage d'être stables, on ne maîtrise/connaît pas le risque lié à la toxicité des interruptions.

Tout comme chez l'homme, on retrouve dans la littérature deux modèles murins (Monckton *et al.*, 1997; Seznec *et al.*, 2001) qui présentent une instabilité germinale et somatique des répétitions contenues dans le transgène (Fortune *et al.*, 2000; Gomes-Pereira *et al.*, 2007). Ces deux modèles ont été créés à partir du gène *DMPK* humain muté. Qu'en est-il des autres modèles murins ? Les répétitions pures sorties de leur contexte restent-elles stables ou l'évolution des autres modèles vers un nombre changeant de répétitions n'a-t-elle pas été publiée ?

Dans le but d'avoir un nombre de répétitions supérieur à 200, notre modèle et plusieurs autres modèles (murins et *Drosophile*) utilisent les répétitions interrompues par le motif CTCGA (Ho *et al.*, 2005b; de Haro *et al.*, 2006; Le Mee *et al.*, 2008). Il est admis que les interruptions permettent de pallier la nature instable des répétitions et l'incapacité à les amplifier par PCR (Leeflang and Arnheim, 1995; Garcia-Lopez *et al.*, 2008; Braidia *et al.*, 2010). Pour ce qui est de la nature plus stable des répétitions interrompues, Le Mee *et al.* ont en effet vérifié chez la *Drosophile* qu'après plus de 100 générations la taille de l'expansion reste inchangée. Cependant, dans la mesure où le transgène n'est pas exprimé dans les lignées « stock » et que la transcription uni- et bi-directionnelle participe à l'instabilité des expansions (Nakamori *et al.*, 2010) je pense que la stabilité des expansions est également liée au caractère inductible des lignées porteuses des répétitions interrompues. Quant à la toxicité qui pourrait être engendrée par l'expression des interruptions CTCGA elle n'a jamais été testée/démontrée. Afin de mesurer un tel effet, il faudrait générer un transgène avec une séquence non codante aléatoire interrompues toutes les 20 paires de bases par CTCGA et faire une transgénèse site-spécifique dans la même lignée qui a permis de générer nos lignées DM1.

4.3. Implication de dSERCA : hypercontraction et/ou fatigue musculaire ?

4.3.1. Dérégulation de l'épissage alternatif de dSERCA

Parmi les transcrits mal épissés dans la DM1, sont retrouvés les ARNm des gènes *SERCA1* et *SERCA2*. Bien que proches, ces gènes ne subissent pas la même altération de l'épissage. En effet, dans le cas de *SERCA1*, le dernier exon (E22) du transcrit est exclu (Kimura *et al.*, 2005; Hino *et al.*, 2007) conduisant à l'expression de l'isoforme fœtale du transcrit et par conséquent à une protéine plus courte. Au contraire, le transcrit *SERCA2* présente une rétention de l'intron 19 (Kimura *et al.*, 2005) qui mène à la production d'une protéine tronquée. Dans le muscle vertébré, *SERCA1* et *SERCA2* ne sont pas co-exprimés au sein d'une même fibre musculaire (Guglielmi *et al.*, 2013). *SERCA1* est spécifique des fibres de type 2 et *SERCA2* des fibres lentes de type 1. Chez la Drosophile, *dSERCA* est orthologue de *SERCA1*, 2 et 3. Nos données de microarray et de qPCR indiquent que l'exon terminal du transcrit *dSERCA* est exclu menant à la production d'une protéine plus courte et ne possédant pas le domaine transmembranaire putatif C-terminal. Ainsi dans le cas de notre modèle de Drosophile, nous observons une altération de l'épissage de *dSERCA* semblable à celle de *SERCA1* dans la DM1.

4.3.2. Altération de l'homéostasie du calcium et fatigue musculaire

SERCA1, *SERCA2*, DHPR et RyR1 participent à l'homéostasie du calcium et présentent tous un défaut d'épissage dans la DM1 (Kimura *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2012). Il a été récemment montré sur des myotubes sains en culture que ~ 2/3 des apports cytosoliques en Ca^{2+} proviennent du RS grâce à RyR1 et que le tiers restant provient du Ca^{2+} extracellulaire grâce à DHPR (Santoro *et al.*, 2013). Chez les patients DM1, la concentration cytosolique au repos est plus élevée avec davantage de calcium provenant du milieu extracellulaire et moins de calcium provenant du RS (Santoro *et al.*, 2013). Il n'a pas été déterminé si la baisse de calcium en provenance du RS est due à une baisse d'activité de RyR1 expliquée par une expression aberrante de son transcrit et/ou si elle est liée à l'activité réduite de *SERCA* qui est également mal épissé et dont le rôle est de recapturer le Ca^{2+} cytosolique vers le RS. Néanmoins, il a été suggéré que l'altération de l'homéostasie du calcium dans la DM1 et en particulier l'expression des transcrits aberrants des gènes *SERCA* est responsable de fatigue musculaire⁴. Les causes de la fatigue sont multiples et encore étudiées. Cependant très récemment il a été suggéré que la contribution de la dérégulation des niveaux de calcium intracellulaires ne semble pas être un facteur majeur de la fatigue musculaire (Hortemo *et al.*, 2013).

⁴ Incapacité du muscle à produire une force

4.3.3. dSERCA et hypercontraction musculaire

Pour comprendre le rôle de l'expression aberrante de *dSERCA* dans notre modèle et suggérer une fonction de la dérégulation de l'épissage de *SERCA1* dans la DM1 nous avons émis et validé l'hypothèse chez la Drosophile que *dSERCA* était impliqué dans les phénotypes d'hypercontraction musculaire observés chez la larve. Notre raisonnement prend en compte plusieurs arguments :

- 1) Il a été montré que la dérégulation de l'expression du canal chlorure était impliquée dans la myotonie observée chez les patients (Charlet *et al.*, 2002). Les puces ADN réalisées sur notre modèle n'ont pas mis en évidence de dérégulation de l'expression du gène codant pour l'orthologue de ce gène (*Cic-a*).
- 2) Une étude récente réalisée sur les souris HSA(LR) qui présentent de la myotonie suggère que la dérégulation du canal chlorure bien qu'impliquée dans l'hyperexcitabilité des jeunes souris ne suffit pas lorsque les souris sont plus âgées pour expliquer la myotonie (Difranco *et al.*, 2012).
- 3) Les patients atteints de la maladie de Brody dont la cause est une mutation dans le gène *SERCA1* présentent un retard de relaxation musculaire (Odermatt *et al.*, 1996; Odermatt *et al.*, 2000).

Suite à nos travaux sur la larve, nous suggérons que l'expression aberrante de *SERCA* chez les patients DM1 pourrait contribuer à la myotonie observée chez les patients en complément de la dérégulation de *CIC-1*. Nous n'excluons pas son rôle dans la fatigue musculaire qui n'a pas été testée dans notre modèle.

4.4. Dérégulations transcriptomiques dépendante de la taille des répétitions CTG

L'analyse transcriptomique sur les larves DM1 a permis d'identifier 9 gènes (*Amy-d*, *CG32444*, *CG9466*, *CG9468*, *Cyp6w1*, *Mhc*, *up*, *CG17597*, *smvt*) dont la dérégulation dépend de la taille des répétitions CTG en corrélation avec la sévérité des phénotypes. La mise au point de thérapies et les essais cliniques nécessitent l'utilisation de biomarqueurs qui permettent d'évaluer la progression de la maladie et la réponse à la thérapie. Dans ce but, l'expression des orthologues de ces gènes sont sur le point d'être testés dans l'équipe sur des cellules en culture de foetus sains et de foetus présentant un nombre différent de répétitions CTG (200, 800 et 2500) (cellules en provenance du laboratoire de Dr. D. Furling, Institut de Myologie, Paris). De la même manière, sont testés sur la Drosophile et les cellules de patients de nouveaux candidats dérégulés sur les puces ADN. Dans le cadre de notre étude, nous nous intéressons à des biomarqueurs dont le niveau d'expression est altéré. Récemment, l'équipe de Charles Thornton a publié une liste de biomarqueurs dont l'épissage

est altéré (Nakamori *et al.*, 2013). Cette étude montre une association entre les défauts d'épissage et la faiblesse musculaire mais pas de corrélation avec la taille de l'amplification CTG dans le muscle. Plus précisément, elle soulève une différence dans la tolérance individuelle aux expansions importantes. Ainsi, bien que dans notre modèle de *Drosophile* il y ait une bonne corrélation entre phénotypes, taille des répétitions et dérégulation du niveau des transcrits, il se peut que l'on ne retrouve pas de dérégulation de leur orthologue qui corrèle avec la taille des répétitions en modèle cellulaire et qu'on les exclus sur cette base alors qu'ils seraient tout de même de bons candidats de la sévérité de la DM1. Il serait peut être plus judicieux de comparer la diminution d'expression des candidats sur des myoblastes des différentes formes de la DM1 (congénitale, juvénile, adulte).

4.5. Rôle du métabolisme et de la pyruvate kinase

L'épissage de la pyruvate kinase musculaire (PKM) est altéré chez les patients DM1 (Nakamori *et al.*, 2013). Dans le modèle murin de Thomas Cooper cet épissage est défectueux de manière dépendante de CUGBP1 et indépendante de MBNL1 (Gao et Cooper, 2013). Il en résulte chez les souris DM1 la réexpression de l'isoenzyme fœtale PKM2 dans le muscle squelettique et le cœur spécifiquement dans les fibres de type 1 sujettes à l'atrophie chez les patients. L'expression de *Pkm2* dans les myotubes en culture n'augmente pas la glycolyse mais augmente significativement la consommation en glucose avec une diminution de la production d'ATP.

Dans le cadre de l'analyse des puces, nous avons observé la diminution de la quantité de transcrits d'un grand nombre de gènes de la glycolyse et du métabolisme oxydatif (Annexe 3). Parmi eux, on retrouve les orthologues de PKM (*CG2964*, *CG7069*). Ces résultats sont en opposition avec ceux de l'équipe de Thomas Cooper. Ils sont d'autant plus contradictoires que les dérégulations observées sont encore plus importantes en contexte atténué pour Mbl. En revanche, nos résultats s'accordent à dire que l'activité de la glycolyse semble normale dans notre modèle.

Il est difficile d'expliquer ces différences sur la base du métabolisme des muscles larvaires qui serait différent du métabolisme des fibres de type 1 vertébrées. En effet, chez la *Drosophile*, on trouve également deux types de muscles ayant des propriétés contractiles et métaboliques distinctes. Les muscles de vol sont généralement considérés comme ayant un métabolisme oxydatif et expriment une isoforme de la myosine leur donnant la propriété de se contracter rapidement. A l'inverse, les muscles larvaires (et les autres muscles adultes) ont de faibles capacités oxydatives et ont une vitesse de contraction faible (Swank *et al.*, 2002; Feala *et al.*, 2007). Afin d'approfondir ces données préliminaires, il serait intéressant de mesurer la production d'ATP dans les muscles larvaires et de s'intéresser de plus près aux mitochondries (quantité, localisation, structure).

II. Implication de Bruno-3, l'orthologue de CUGBP1, dans la DM1

Une seconde partie de mon travail a été d'évaluer si Bru-3 présenté comme l'orthologue de CUGBP1 avait un rôle dans la DM1 en caractérisant les muscles somatiques larvaires de lignées gain de fonction *bru-3*. Un manuscrit initialement prévu pour être soumis dans Molecular Biology of the Cell est en cours de préparation.

Article 2 :

Drosophila CUGBP1 orthologue, Bruno-3, contributes to muscle phenotypes of Myotonic Dystrophy type 1 and regulates sarcomere components synthesis

Picchio L, Renaud Y, Jagla K

En préparation

Avertissement: le manuscrit étant en cours de préparation, les encadrés bleus dans les figures indiquent les données qui seront modifiées ou complétées d'ici la soumission. Merci de votre compréhension.

***Drosophila* CUGBP1 orthologue, Bruno-3, contributes to muscle phenotypes of Myotonic Dystrophy type 1 and regulates sarcomere components synthesis**

L. Picchio, Y. Renaud and K. Jagla[†]

GReD (Genetics, Reproduction and Development laboratory), INSERM 1103, CNRS 6293, University of Clermont-Ferrand, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France

† author for correspondence: christophe.jagla@udamail.fr

RUNNING HEAD: Bru-3 in DM1 and healthy larval muscles

ABBREVIATIONS: Muscleblind-like 1 (MBNL1); myotonic dystrophy type 1 (DM1); CUG-Binding Protein 1 (CUGBP1); Bruno-3 (Bru-3)

ABSTRACT

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a multisystemic disorder caused by toxic non coding CUG repeat transcripts leading to altered levels of two RNA binding factors, MBNL-1 and CUGBP1. However, the effect of non coding repeats on CUGBP1 stabilization and its contribution to DM1 phenotypes are controversial. Here we used *Drosophila* model to identify DM1 phenotypes that are CUGBP1 dependent and potential downstream targets of CUGBP1.

To mimic CUGBP1 stabilization we applied muscle targeted expression of its *Drosophila* orthologue *Bruno-3* (*Bru-3*). Using an antibody raised against Bru-3, we show Bru-3 is normally expressed in muscle fibers and in addition to nuclear expression shows specific sarcomeric pattern. We also demonstrate by comparing muscle phenotypes of *bru-3* gain of function line with that of DM1₉₆₀ line that Bru-3 causes motility phenotypes, splitting fiber, reduced myofiber length and altered myoblast fusion. However, Bru-3 has no role in a most symptomatic DM1 phenotype, muscle hypercontraction. Interestingly, a genome wide transcriptomic analysis revealed that Bru-3 negatively regulates several genes encoding sarcomere components. We provide evidence that cytoplasmic Bru-3 co-localizes with sarcomere components transcripts and propose it regulates their stability, distribution and *in situ* translation at appropriate sarcomeric location.

Introduction

Finding that 75% of human disease-related genes have functional orthologues in the fruit fly (Rubin *et al.*, 2000) stimulated development of *Drosophila* models for inherited disorders and among them or neuromuscular diseases (Chartier *et al.*, 2006; Shcherbata *et al.*, 2007; Garcia-Lopez *et al.*) including that of myotonic dystrophy of type 1 (DM1) (de Haro *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2011; Picchio *et al.*, 2013). DM1, which affects 1/8000 people worldwide, is an autosomic dominant disease caused by an unstable CTG repeats expansion in the 3' untranslated region of the *DMPK* gene on chromosome 19 (Brook *et al.*, 1992; Fu *et al.*). One peculiarity of DM1 is its multisystemic feature. Indeed, patients display symptoms ranging from baldness and cataract to myotonia, muscle weakness/loss, heart blocks as well as sterility, digestive troubles and DM1 type 2 diabetes (Fardaei *et al.*). Importantly, the severity of symptoms is positively correlated with the size of CTG expansion (Kroksmark *et al.*, 2005) which can vary from 50 to several thousands triplet repeats in the most severe congenital form of DM1. It is well accepted that in muscle cells, mutated *DMPK* transcripts with large CTG expansion form secondary structures (Mooers *et al.*, 2005) able to sequester the Muscleblind-like 1 (MBNL1) splicing factor and eventually aggregate into foci within nuclei (Taneja *et al.*, 1995; Davis *et al.*, 1997). The importance of this factor for DM1 pathogenesis was already shown in transgenic mouse model (Kanadia *et al.*, 2006) as well as fly models (de Haro *et al.*, 2006; Picchio *et al.*, 2013). Besides, by a not-yet determined mechanism, PKC α is hyperactivated and stabilizes through hyperphosphorylation the splicing factor CUG-Binding Protein 1 (CUGBP1) (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007). MBNL1 and CUGBP1 play antagonistic roles in regulating alternative splicing of CLCN1 (Charlet *et al.*, 2002; Kino *et al.*, 2009), InR (Savkur *et al.*, 2001; Tran *et al.*, 2011) and cTNT (Philips *et al.*, 1998; Tran *et al.*, 2011) transcripts. The reverse balance of MBNL1 and CUGBP1 in DM1 leads to the mis-splicing of these latter pre-mRNAs explaining respectively myotonia, diabetes and reduced myocardial function observed in patients. Some other transcripts like α -actinin (Suzuki *et al.*, 2002), Myh14 (Rinaldi *et al.*) or Tau (Dhaenens *et al.*, 2011) have been shown to be mis-spliced specifically by CUGBP1 in DM1. In addition to its role in alternative splicing regulation (Philips *et al.*, 1998; Ladd *et al.*, 2001, 2004), CUGBP1 is involved in translation regulation (Timchenko *et al.*, 1999; Mukhopadhyay *et al.*, 2003; Iakova *et al.*, 2004), mRNA deadenylation and decay (Paillard *et al.*, 2003; Vlasova *et al.*, 2008; Le Tonquèze *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010b; Rattenbacher *et al.*, 2010) as well as RNA editing (Anant *et al.*, 2001). Thus CUGBP1 accumulation in DM1 patients can lead to various alterations in transcript processing.

The role of CUGBP1 in heart and skeletal muscle troubles observed in DM1 has been shown in mice models overexpressing CUGBP1 (Timchenko *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007). It has also been demonstrated that adult flight muscle degeneration in *Drosophila* inducible DM1 line can worsen by overexpressing human CUGBP1 (de Haro *et al.*, 2006).

However, the role of *Drosophila* CUGBP1 orthologue and its impact on DM1 associated muscle phenotypes has not yet been analyzed. Among *aret*, *bruno-2* and *bruno-3*, the three CUGBP1 like *Drosophila* genes (Good *et al.*, 2000; Delaunay *et al.*, 2004), the protein encoded by the ubiquitously expressed *bruno-3* is the only that carries both the RRM and the Ims functional domains – and thus appears to be the CUGBP1 orthologue (Delaunay *et al.*, 2004).

To validate Bruno-3 as a *Drosophila* CUGBP1 counterpart and to better understand mechanistic aspects of CUGBP1 function in skeletal muscle impairment in DM1, we took advantage of *Drosophila* model to analyze effects of muscle targeted expression of Bruno-3.

We recently generated a set of inducible site-specific *Drosophila* DM1 lines expressing an increasing number of non-coding CUG repeats in larval somatic muscles (Picchio *et al.*, 2013). Among them, the high repeat number *DM1₉₆₀* line which carries 960 interrupted CTG repeats displays particularly severe muscle phenotypes reminiscent to those observed in DM1 patients. Here to get insight into specific contribution of CUGBP1/Bruno-3 to the DM1-associated muscle defects, we compared phenotypes – induced by muscle targeted overexpression of *bru-3* – a context mimicking stabilization of CUGBP1 observed in DM1, with those of *DM1₉₆₀*. Furthermore, we performed genetic rescue experiment by analyzing *DM1₉₆₀* phenotypes in a *bru-3* deficiency context. Finally, to investigate gene deregulations caused by an increased *bru-3* level in muscle cells, we performed transcriptional profiling analyses. More precisely, we compared pools of genes deregulated by muscle-targeted overexpression of *bru-3* with those identified in *DM1₉₆₀* and *MbIRNAi* contexts (Picchio *et al.*, 2013).

Results

Drosophila Bru-3 shares high sequence homology with CUGBP1 and is expressed in larval somatic muscles

The sequence similarity and conservation of functional domains (Figure 1A) suggested that Bru-3 represents functional orthologue of CUGBP1. As targeting CUG repeat expression to embryonic/larval muscles results in DM1-like muscle phenotypes in 3rd instar larvae (Picchio *et al.*, 2013) we tested whether Bru-3 protein can be detected in larval muscles in wild type and in DM1 context. To characterize Bru-3 expression pattern we generated antibody directed to a peptide sequence specific to Bru-3 (Figure 1A). As shown in Figure 1B Bru-3 protein is detected in larval body wall muscles and displays a stripped pattern on both sides of the Z line (Figure 1E). This sarcomeric Bru-3 protein accumulation appears specific and is attenuated in DM1960 muscles with heterozygous deficiency (Figure 1D, G) and in muscles dissected from Bru-3 RNAi knockdown larvae (Figure 1E, G). Interestingly, a low level of Bru-3 is also detected in the nuclei of muscle fibers (Figure 1B',

B'''), reflecting the potential Bru-3 role as a splicing factor as well as around nuclei at muscle surface in a discrete dotted pattern (Figure 1B'''). Also, we observe that Bru-3 expression pattern in muscles of DM1₉₆₀ larvae is similar to that of wild type (Figure 1C). However, we noticed an increased intensity of fluorescent signal detected by Bru-3 antibody (Figure 1C, G), which suggests that like CUGBP1, the Bru-3 protein level is higher in DM1 cytoplasm. To mimic the increased Bru-3 protein levels and test its function in DM1 condition we overexpressed *bru-3* using muscle-specific *Mef-Gal4* driver. We first assessed *bru-3* expression using RT-qPCR in two gain of function lines (*Mef>bru-3(43)* and *Mef>bru-3(37)*) and found that *bru-3* transcript level is respectively 5 times and 15 times higher compared to control lines (Figure 1H). Following this observation we chose for further analyses the *bru-3(37)* line inducing a higher levels of *bru-3* expression. Muscle targeted expression of Bru-3 using this line leads to a high Bru-3 protein accumulation in sarcomeres (Figure 1I) and in particular in muscle nuclei (Figure 1I').

Bru-3 overexpression contributes to impaired motility and muscle morphology defects observed in DM1

To assess the functionality of muscles with an increased Bru-3 level, we performed a righting assay by putting the larva on its back and recording the time it takes to revert to ventral position. As observed, all control lines need about 5 seconds to achieve this exercise whereas *Mef>bru-3(37)*, *Mef>bru-3(43)* and *DM1₉₆₀* lines need respectively 10, 15 and 22 seconds (Figure 2A). Surprisingly, the *bru-3* deficiency restores completely the motility of the *DM1₉₆₀* line (Figure 2A). To test whether muscle defects are at the origin of impaired larva motility we scored morphological abnormalities in the body wall musculature of 3rd instar larva. Mainly, the defects identified were splitting fibers and extra fibers (Figure 2B), with extra fibers already defined as a consequence of extreme muscle fiber splitting (Picchio *et al.*, 2013). The total number of defects observed was significantly increased in pathological lines compared with the *Mef>lacZ* control line (Figure 2C). It is noteworthy that the number of defects was more important in the strongest *bru-3* gain of function line *Mef>bru-3(37)* line than the *Mef>bru-3(43)*. We also noticed a significantly reduced number of splitting fibers in the *DM1₉₆₀,df(bru-3)* rescue line compared to *DM1₉₆₀* line (Figure 2C) suggesting that Bru-3 accumulation in DM1 condition induces splitting fiber phenotype. Altogether, these data indicate an important contribution of Bru-3 to the altered muscle performance and the morphological muscle defects observed in our *Drosophila* DM1 model.

It is well known that in cell culture the fusion ability of DM1 myoblasts or satellite cells is altered (Amack and Mahadevan, 2001; Furling *et al.*, 2001) and impacts on myotube size. We have recently shown that in *Drosophila* the larval ventro-lateral muscles are shorter and display significantly reduced number of nuclei in DM1 lines (Picchio *et al.*, 2013). Here, we investigated whether Bru-3 overexpression in somatic muscles can reproduce this phenotype. Indeed, we observed that the size of relaxed Ventro-Lateral 3 (VL3) fibers is

significantly decreased and the number of nuclei per fiber is significantly reduced in *Mef>bru-3(43)* and *Mef>bru-3(37)* lines (Figure 3A). However, fiber length is only partially restored and increase in number of nuclei is not significant in *DM1₉₆₀,df(bru-3)* larvae (Figure 3A, B) indicating that Bru-3 contributes to muscle fusion phenotypes observed in DM1 lines but is not sufficient for their restoration. One can note that nuclei are normally distributed along the fiber in *bru-3* gain of function context (Figure 3C). As the *bru-3* overexpression resulted in shortening of muscle fibers we checked whether fiber growth was affected by counting the number of sarcomeres. As shown in Figure 3D, the number of sarcomeres along muscle fiber remains unchanged in pathological lines compared with controls, meaning that growth does not contribute to Bru-3 induced reduced fiber's length.

DM1 hypercontraction is not Bru-3-dependent

Myotonia is a key symptom observed in DM1 patients. It was shown on *Drosophila* embryo (Artero *et al.*, 1998) and on DM1 larvae (Picchio *et al.*, 2013) that *Mbl* is involved in muscle hypercontraction. In order to evaluate the role of Bru-3 in muscle hypercontraction observed in *Mef>960CTG* line, we measured sarcomere size following Z-line staining with phalloidin. As illustrated by figure 3F, the distance between two Z lines corresponding to the distance between two peaks, is not affected in *bru-3* gain of function lines compared with the *Mef>lacZ* control line (Figure 3E). This result suggests that Bru-3 overexpression does not affect muscle relaxation. Consequently, sarcomere size is still reduced in the *DM1₉₆₀,df(bru-3)* line as it is in the *DM1₉₆₀* line, supporting a view that Bru-3 is not involved in hypercontracted muscle phenotype in *Drosophila* model of DM1 (Figure 3, E and F).

Global gene deregulation in bru-3 gain of function context illustrates its partial contribution to DM1 phenotypes

To get a more global view on the extent of *Bru-3* contribution to CTG repeats-induced gene deregulations, we compared microarray data from our previous work (*Mef>mbIRNAi*, *Mef>600CTG* and *Mef>960CTG*) (Picchio *et al.*, 2013) with that of *Mef>bru-3* transcriptomic data. The comparison of the datasets was facilitated by the fact that the same microarrays as well as the same controls were used. As observed on the Venn diagrams in Figure 4, *bru-3* gain of function represents 32% of down regulated gene expression observed in DM1 against 82% for *mbl* attenuation (Figure 4a). For the up-regulated genes, *Mef>bru-3* represents 53% of deregulations against 70% for *Mef>mbIRNAi* (Figure 4b).

Hence, the extent of gene deregulations indicates that the *bru-3* dependent transcriptomic perturbations common with DM1 line are less important than those dependent on *mbl*. This is consistent with the finding that DM1 induced muscle hypercontraction is also observed in *Mef>mbIRNAi* but not in *Mef>bru-3* gain of function context.

Transcriptional profiling of *bru-3* gain of function line reveals deregulation of genes encoding sarcomeric components

DM1-like muscle phenotypes observed in *bru-3* gain-of-function lines prompted us to perform a global gene expression analysis. By comparing effects of muscle-targeted expression of Bru-3 with that of control *lacZ* gene we identified 396 up-regulated and 451 down-regulated genes (Figure 5A). A GO classification of down- (Figure 5B) and up-regulated genes (Figure 5C) showed that genes implicated in oxidation-reduction process and those encoding sarcomeric proteins were mainly down regulated. As deregulation of sarcomere components may lead to fragilizing muscle structure and splitting of muscle fibers, a phenotype observed in both DM1 patients and our DM1 *Drosophila* model, we focused on this category of genes (Table 1 and Figure 5A). We found that the increased level of Bru-3 leads to down regulation of 11 genes encoding sarcomeric proteins including α -Actinin (*Actn*), Myosin heavy and light chains (*Mhc*, *Mlc1* and *Mlc2*), Tropomyosin 1 (*Tpm1*), Troponin I and C47D (*wupA* and *TpnC47D*), *Bent*, Paramyosin (*Prm*), *Zasp52* and *unc-49*. When tested by RT-qPCR in *bru-3* gain of function context, except *Bent*, all the candidates display significantly decreased expression (Figure 5D) thus validating the global gene expression data. Interestingly, expressions of *Actn*, *Mhc*, *Mlc1*, *Mlc2*, *Tm1*, *TpnC47D*, *unc-89* and *wupA* were also significantly decreased in DM1 context and rescued partially or totally by *bru-3* deficiency providing evidence for *bru-3* dependent down regulation of sarcomeric genes in DM1. To check whether in normal conditions Bru-3 co-localizes with the transcripts of down regulated genes, we performed fluorescent *in situ* hybridizations followed by Bru-3 immunostaining. We observed that all transcripts tested (*Mlc-1*, *Actn*) colocalized with Bru-3 (Figure 5E) in wild type larval muscles. More precisely, we observed that in addition to its expression in sarcomeres, Bru-3 exhibits a dotted expression around the nuclei with large spots close to the nuclear envelope and smaller scattered around. Interestingly, RNAs of *mlc-1*, *actn* co-localize with these dots while they don't with sarcomeric Bru-3. This observation suggests that cytoplasmic Bru-3 binds to sarcomeric gene transcripts when they exit the superficially lying nuclei and carries them inside muscle fibers to the areas they are translated and can directly integrate sarcomeres. The link between Bru-3 and the RNA of sarcomeric genes could ensure transcript stability during RNA distribution within the muscle cell and in consequence a more efficient turnover of sarcomeric components.

Bru-3-induced transcriptional deregulation of sarcomeric genes impacts on expression pattern of corresponding proteins

To assess the consequences of decreased transcripts levels of sarcomeric genes on expression pattern of their protein products, we analyzed sarcomeric expression profiles of *Mhc*, *Prm*, *Tm2*, *Zasp52* and *Actn*, five candidate genes for which specific antibodies are available. Surprisingly, we found all proteins tested easy to detect in *bru-3* gain of function context (Figure 6), even if their transcripts levels were reduced. *Prm*, *Tm2* and

Zasp52 proteins were properly localized in the sarcomeres in both *Mef>bru-3* and *Mef>960CTG* contexts whereas Mhc and Actn were not (Figure 6). Mhc labeling M line only in wild type muscle was found to be ectopically expressed in the I-band in both pathological contexts (Figure 6 D and G). In addition, Actn that localizes to the Z-line in wild type situation shifted to a broad A line stripe in *Mef>bru-3(37)* larval muscles (Figure 6F).

Thus, our data show that despite down regulation of their transcripts, sarcomeric proteins appear strongly expressed in *bru-3* gain of function context. The differences in transcript and corresponding protein levels can potentially results from aberrantly slow turnover of sarcomeric components, which as observed in Mhc and Actn case may lead to their mis-localization.

Discussion

Molecular mechanisms underlying DM1 are particularly complex. Among them the disruption of the balance between the splicing factors MBNL1/CUGBP1 (Ho *et al.*, 2005; Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007), transcription factors deregulations (Ebraldize *et al.*, 2004; Yadava *et al.*, 2008; Dansithong *et al.*, 2011) or altered maturation of miRNA (Perbellini *et al.*, 2011; Rau *et al.*, 2011) all lead to perturbations in transcripts levels. MBNL1 sequestration and CUGBP1 accumulation are the first and most studied mechanisms of DM1 pathogenesis. However, the specific contribution of CUGBP1 to DM1 associated phenotypes has not yet been entirely defined. As 77% of human genes involved in diseases have a orthologue in *Drosophila melanogaster* (Reiter *et al.*, 2001), we hypothesized that CUGBP1 orthologue function could be studied in DM1 *Drosophila* model generated in our lab and thus contribute to shed light on its significance.

As 77% of human genes involved in diseases have a functional orthologue in *Drosophila* (Reiter *et al.*, 2001), we hypothesized that the fly CUGBP1 orthologue function could be studied in *Drosophila* and thus contribute to shed light on its significance in DM1. Importantly, carrying all CUGBP1 functional domains *Drosophila* gene *bru-3* is expressed in larval muscles and appears well suited for mimicking stabilization of CUGBP1 and performing phenotypical analyses.

Bru-3 gain of function reproduces some but not all DM1 muscle phenotypes

Contrary to *mbf* attenuation which reproduces all muscle phenotypes observed in DM1 larvae (Picchio *et al.*, 2013), *bru-3* gain of function phenocopies only some of them. Indeed, we observed that as toxic repeats expression, both *Mef>bru-3* lines lead to impaired motility, fiber splitting, fiber shortening and altered myoblast fusion. The specific role of Bru-3 in these DM1-associated muscle phenotypes is further supported by the capacity of *bru-3* heterozygous deficiency to partially rescue DM1₉₆₀ muscle defects. However, hyper-contraction, the most symptomatic DM1 muscle phenotype, cannot be reproduced by an

increased Bru-3 level in muscles and thus is not Bru-3 dependent. Taken together these data indicate specific contribution of Bru-3 to DM1-associated muscle defects and show that its accumulation is not involved in larval muscle hypercontraction. The partial *bru-3* contribution to DM1 phenotypes is also illustrated by the comparison of global gene deregulation in *bru-3* gain of function with that of toxic repeats expressing DM1 lines. The down and up-regulated genes common for these two conditions represent respectively 32% and 53% against 82% and 70% for common genes down and up-regulated in *mbIRNAi* vs. DM1 contexts.

Aberrant expression of sarcomere component transcripts and proteins in DM1 larval muscles

It was already demonstrated that some sarcomere component transcripts are mis-spliced in DM1 because of MBNL1 or CUGBP1 alterations. Among them PDLIM3 (Lin *et al.*, 2006), MYH14 (Rinaldi *et al.*, 2011), MYOM1 (Koebis *et al.*, 2011), TNNT2 (Philips *et al.*, 1998), TNNT3 (Lin *et al.*, 2006; Vihola *et al.*, 2010; Yamashita *et al.*, 2012), TTN (Lin *et al.*, 2006) can be mentioned. Besides, Vihola and colleagues observed an up-regulation of *MYH* mRNAs but no effect on overall MYH protein level in DM1 sample tissues (Vihola *et al.*, 2010) apart from abnormal distribution of the protein in atrophic fibers. In our study, both microarray and qPCR data show decreased mRNA levels of *Mhc* and several other sarcomere component transcripts. Besides, we observe an increased protein level (to validate by Western Blot). Our divergent observation could be either due to technical issues or inherent to the subject of study. Considering technical issues, MHC expression was assessed using ACTN2/3 to normalize its expression (Vihola *et al.*, 2010). We observed that its orthologue in fly Actn is down regulated in pathological conditions. Thus, one can consider that if ACTN2/3 expression is also altered in DM1 patients, it would not be a good candidate for normalizing Western Blot data and thus MHC levels might be altered. Our second hypothesis to explain differences in observation is that although sarcomeres have well-conserved structure and function the turnover of components that build it might work differently in flies and vertebrates. Despite differences in transcript and protein expression levels, in the end, MHC/Mhc proteins are aberrantly localized in both DM1 flies and DM1 patients (Vihola *et al.*, 2010).

Potential cytoplasmic Bru-3 functions in muscles

To our knowledge, even if no immunostaining of CUGBP1 was performed on muscle tissues, it is known that CUGBP1 displays diffuse nuclear expression in cell culture myoblasts (de Haro *et al.*, 2013). Thus we were surprised when we observed Bru-3 expression in the sarcomeres. As the antibody was raised against a 23 amino acids sequence specific to the protein and as pre-immune serum does not detect any signal by immunostaining (not shown), we ruled out the possibility that our antibody can target a protein different from Bru-3. Contrary to common beliefs, more and more evidences demonstrate that RNA binding proteins are expressed in the sarcomeres. For instance, the splicing factor Mbl

is expressed in the H-band of *Drosophila* muscles and regulates the localization in the sarcomeres of two other RNA binding proteins, TBPH and BSF (Llamusi *et al.*, 2012). In mammals, FXR1 (Fragile X-related protein 1) colocalizes with Z-discs of striated and cardiac muscles (Khandjian *et al.*, 1998; Mientjes *et al.*, 2004; Whitman *et al.*, 2011) but the role of sarcomeric localization of this and other mentioned above proteins remains unknown.

Here, we show that in larval somatic muscles, Bru-3 co-localizes with several sarcomere component transcripts. We expect Bru-3 regulates their stability since their level is significantly decreased in *Mef>bru-3* and *Mef>960CTG* conditions. *In situ* hybridization experiments show that the interaction takes place in the cytoplasm around the nuclei. As large spots positive for Bru-3 and sarcomere component transcripts are detected near the nuclei and as their size decreases proportionally to the distance from the nucleus, we hypothesize that Bru-3 binds to the transcripts when they exit the nuclei and distribute them in the cytoplasm (Figure 7). It has been proposed (Zarnescu and Gregorio, 2013) that sarcomere transcripts are transported to the site where they will be translated to allow efficient turnover of sarcomeric proteins. Several lines of evidence support this idea. First, *in situ* translation is a most appropriate way to avoid trafficking of large sarcomeric proteins such as the largest human protein Titin (Bang *et al.*, 2001). Second, *in situ* translation can indeed take place in sarcomeres since polyribosomes aligned along myosin thick filaments were observed in differentiating myofibrils (Heywood *et al.*, 1967; Allen and Terrence, 1968). Also, the number of polyribosomes appears proportional to the translational activity and is increased in the A band of sarcomeres of hypertrophic muscles (Horne and Hesketh, 1990). Associated with sarcomeric transcripts Bru-3 might contact polyribosomes already present there to allow transcripts translation. In mammals, it is already known that Bru-3 orthologue CUGBP1 interacts with the ribosomal protein eIF2 α (Timchenko *et al.*, 2006). We hypothesize that Bru-3 lying on both sides of Z line regulates transcript translation whereas spotty Bru-3 detected around the nuclei is rather involved in transcript transport and stability (Figure 7).

Following *in situ* hybridizations which show a co-localization between Bru-3 and sarcomere transcripts, we thought that if they interact directly, sarcomere components transcripts should share a common motif in their 3' untranslated region (Masuda *et al.*, 2012). It is known that AU-rich elements encompassing UGU motifs are important for CUGBP1 regulation of transcript stability (Marquis *et al.*, 2006; Vlasova *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Indeed, by analyzing 3'-UTR sequences of down regulated sarcomere component transcripts we could also observed motifs with potential role in transcript stability (Supplemental Material 1).

In summary, this study shows that the *Drosophila* CUGBP1 orthologue Bru-3 contributes to an important part of DM1 muscle phenotypes but is not involved in myotonia. Transcriptional profiling of *bru-3* gain of function line reveals a novel role of Bru-3 in DM1 demonstrating its role in regulation of sarcomere component transcripts stability. We propose

that Bru-3 controls stability and distribution of sarcomeric transcripts and is involved in their proper *in situ* translation (Fig. 7). We hypothesize that in Bru-3 gain of function context, an increase in levels of Bru-3 results in destabilization of sarcomeric transcripts not yet engaged in translation, leading to the sarcomeric transcripts decay and slowing down turnover of the corresponding protein.

Materials and methods

Drosophila strains and crosses

All *Drosophila melanogaster* stocks were grown and crossed on standard medium at 25°C. The site-specific inducible *UAS-960CTG* line that expresses 960-interrupted CTG has been described previously (Picchio *et al.*, 2013). This line was recombined with the *Df(3L)Exel6119* line obtained from the Drosophila Stock center (Bloomington, IN, USA) and referred to as *UAS-960CTG,df(bru-3)*. *bru-3^{d09837}* and *bru-3^{d09843}* respectively mentioned as *UAS-bru-3(37)* and *UAS-bru-3(43)* as well as *w¹¹¹⁸*; *P{UAS-lacZ.B}melt^{Bg4-1-2}* were also obtained from the Drosophila Stock Center (Bloomington, IN, USA). *bru-3^{KK111663}* referred to as *UAS-bru-3RNAi* line was obtained from the Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC, Vienna, Austria). Transgene expression was specifically driven in somatic muscles thanks to the *Mef>mCD8GFP* line (gift from A. Paululat) or *Mef-Gal4* line from the Bloomington Stock Center (#27390). Transgenic control lines were obtained by crossing transgenic lines with standard *w¹¹⁵¹*. Driver control lines was obtained by crossing the driver line with the *UAS-lacZ* line.

Motility test, muscle pattern assessment and measurements

The righting assay and muscle pattern assessment and measurements were performed as previously described (Picchio *et al.*, 2013).

Microarray analysis

Three independent total RNA isolations were performed on *Mef>bru-3(37)* and *Mef>lacZ* 3rd instar larvae using TRIzol reagent (Invitrogen). The Agilent Drosophila gene expression microarray was used (Agilent, G2519F, Strasbourg, France). Treeview (version 1.60, University of California at Berkeley) was used to confirm the similarity (>70% Pearson correlation) between triplicates. A cut-off was set for a p-value <0.001 and a 2-fold increase/decrease. Differentially expressed genes were then classified according to the biological process they are involved in (Flybase). Microarray data are available in the ArrayExpress database with accession number XXXXXXXX.

RT-qPCR

Total RNA was extracted from whole 3rd instar larvae using TRIzol reagent (Invitrogen). Then, 5 µg of total RNA were treated with DNase I and reverse transcribed (RT) with SuperScriptIII First Strand Synthesis System following instructions from the provider (Invitrogen). Quantitative PCR was performed in a final volume of 20 µL using Power SYBR Green PCR Master Mix (Roche, Applied Science) on LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Applied Science). The primers combinations used are presented in Table 2. The relative quantifications of transcripts were obtained with $\Delta\Delta C_t$ method. Owing to the small number of samples, we opted for the non parametric Kruskal-Wallis ANOVA test to compare each genotype in order to determine whether their differences of distribution were significant. When appropriate, non parametric Mann-Whitney tests were performed to compare control samples and samples of interest.

In situ hybridization and immunofluorescent staining of Drosophila larval muscles

Third instar larva dissections were performed in 0.9% NaCl buffer containing 25 mM EDTA (except in the fiber contraction assay when EDTA was not added). Larval muscles were then fixed for 10 min in 4% formaldehyde on the plate, transferred to an Eppendorf tube, rinsed three times for 5' in 1X PBS, 0.5% Tween (PBT), blocked for 20 min in 1X PBT, 20% horse serum at room temperature. Incubation with primary antibody was performed for 2 h at room temperature with mouse monoclonal anti-Lamin C 28.26 (1:600; Hybridoma bank, Iowa, USA), rabbit anti-Bru-3 (1:1000; Millegen, Toulouse, France), rat anti-Mhc (1:1000; BT-GB-147P, Babraham technologies, UK), rat anti-actn (1:200; BT-GB-276P, Babraham technologies, UK), rat anti-Tm2 (1:200; BT-GB-141P, Babraham technologies, UK), rabbit anti-Zasp52 (1:200; (Katzemich *et al.*, 2011)), rabbit anti-Prm (1:100; (Maroto *et al.*, 1996)). Muscles were then washed three times for 10 min with 1X PBT and incubated with fluorescent secondary antibodies (1:300; Jackson Immuno-Research) for 1 h at room temperature and (or) with phalloidin-TRITC (1:1000; Sigma P1951) or Alexa Fluor® 647 Phalloidin (Invitrogen, A22287).

For sarcomeric protein transcripts detection, *in situ* hybridization with TSA amplification system (Perkin-Elmer) on larval muscles was proceeded as previously described (Nagaso *et al.*, 2001). Immunostaining was performed in parallel to Dig detection procedure. Mlc-1 and actn Gold collection clones RE07220 and LD37956 were used to generate Dig-labeled RNA probes. Leica SP8 confocal microscope was used to acquire images.

In situ hybridization on larval muscles to detect foci was performed as previously described (Houseley *et al.*, 2005). Foci were imaged with Leica SP5 confocal microscope.

Statistics

All statistical analysis were performed using Graph Pad Prism (GraphPad Inc, USA, version 5.02) software. Normality of the samples was assessed with Kolmogorov-Smirnov test. One-way ANOVA tests (Newman-Keuls multiple comparison test or Dunn's multiple comparison post-test) were used for statistical comparisons of each pathologic line against its respective driver control line and/or transgenic control line. The smallest significance of both comparisons is reported on the graph. Mann-Whitney test was performed only to compare *DM1₉₆₀* line vs. *DM1₉₆₀,df(bru-3)* in rescue experiments. Results are reported as mean ± standard error of the mean (SEM), with $p < 0.05$ considered as statistically significant.

Acknowledgments

Tom Cooper, Martine Simonelig, Nicolas Charlet-Berguerand, Margarita Cervera, Frieder Schöck

REFERENCES

- Allen, E.R., and Terrence, C.F. (1968). Immunochemical and ultrastructural studies of myosin synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 60, 1209-1215.
- Amack, J.D., and Mahadevan, M.S. (2001). The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1879-1887.
- Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., M, M., Perez-Alonso, M., and Baylies, M. (1998). The muscleblind gene participates in the organization of Z bands and epidermal attachments of drosophila muscles and is regulated by Dmef2. *Developmental biology* 195.
- Bang, M.L., Centner, T., Fornoff, F., Geach, A.J., Gotthardt, M., McNabb, M., Witt, C.C., Labeit, D., Gregorio, C.C., Granzier, H., et al. (2001). The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res* 89, 1065-1072.
- 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.
- Charlet, B.N., Savkur, R.S., Singh, G., Philips, A.V., Grice, E.A., and Cooper, T.A. (2002). Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol. Cell.* 10, 45-53.
- Chartier, A., Benoit, B., and Simonelig, M. (2006). A *Drosophila* model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *EMBO J* 25, 2253-2262.
- 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.
- Davis, B.M., McCurrach, M.E., Taneja, K.L., Singer, R.H., and Housman, D.E. (1997). Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7388-7393.
- de Haro, M., Al-Ramahi, I., De Gouyon, B., Ukani, L., Rosa, A., Faustino, N.A., Ashizawa, T., Cooper, T.A., and Botas, J. (2006). MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2138-2145.
- de Haro, M., Al-Ramahi, I., Jones, K.R., Holth, J.K., Timchenko, L.T., and Botas, J. (2013). Smaug/SAMD4A restores translational activity of CUGBP1 and suppresses CUG-induced myopathy. *PLoS Genet.* 9, e1003445.
- Delaunay, J., Le Mee, G., Ezzeddine, N., Labesse, G., Terzian, C., Capri, M., and Ait-Ahmed, O. (2004). The *Drosophila* Bruno paralogue Bru-3 specifically binds the EDEN translational repression element. *Nucleic Acids Res.* 32, 3070-3082.

- Dhaenens, C.M., Tran, H., Frandemiche, M.L., Carpentier, C., Schraen-Maschke, S., Sistiaga, A., Goicoechea, M., Eddarkaoui, S., Van Brussels, E., Obriot, H., 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, 732-742.
- Ebraldze, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebraldse, K., and Junghans, R.P. (2004). RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science* 303, 383-387.
- 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.
- Fu, Y.H., Pizzuti, A., Fenwick, R.G., Jr., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P.W., Dubel, J., Nasser, G.A., Ashizawa, T., de Jong, P., et al. (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255, 1256-1258.
- Furling, D., Coiffier, L., Mouly, V., Barbet, J.P., St Guily, J.L., Taneja, K., Gourdon, G., Junien, C., and Butler-Browne, G.S. (2001). Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2079-2087.
- Garcia-Lopez, A., Monferrer, L., Garcia-Alcover, I., Vicente-Crespo, M., Alvarez-Abril, M.C., and Artero, R.D. (2008). Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in *Drosophila*. *PLoS ONE* 3, e1595.
- Good, P.J., Chen, Q., Warner, S.J., and Herring, D.C. (2000). A family of human RNA-binding proteins related to the *Drosophila* Bruno translational regulator. *J. Biol. Chem.* 275, 28583-28592.
- Heywood, S.M., Dowben, R.M., and Rich, A. (1967). The identification of polyribosomes synthesizing myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 1002-1009.
- 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.
- Horne, Z., and Hesketh, J. (1990). Increased association of ribosomes with myofibrils during the skeletal-muscle hypertrophy induced either by the beta-adrenoceptor agonist clenbuterol or by tenotomy. *Biochem J* 272, 831-833.
- Houseley, J.M., Wang, Z., Brock, G.J., Soloway, J., Artero, R., Perez-Alonso, M., O'Dell, K.M., and Monckton, D.G. (2005). Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* 14, 873-883.
- Jagla, K., Jagla, T., Heitzler, P., Dretzen, G., Bellard, F., and Bellard, M. (1997). ladybird, a tandem of homeobox genes that maintain late wingless expression in terminal and dorsal epidermis of the *Drosophila* embryo. *Development* 124, 91-100.
- Kanadia, R.N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S.G., Wheeler, T.M., Thornton, C.A., and Swanson, M.S. (2006). Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11748-11753.
- Katzemich, A., Long, J.Y., Jani, K., Lee, B.R., and Schock, F. (2011). Muscle type-specific expression of Zasp52 isoforms in *Drosophila*. *Gene Expr Patterns* 11, 484-490.

- Khandjian, E.W., Bardoni, B., Corbin, F., Sittler, A., Giroux, S., Heitz, D., Tremblay, S., Pinset, C., Montarras, D., Rousseau, F., et al. (1998). Novel isoforms of the fragile X related protein FXR1P are expressed during myogenesis. *Hum. Mol. Genet.* *7*, 2121-2128.
- Kino, Y., Washizu, C., Oma, Y., Onishi, H., Nezu, Y., Sasagawa, N., Nukina, N., and Ishiura, S. (2009). MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acids Res.* *37*, 6477-6490.
- Koebis, M., Ohsawa, N., Kino, Y., Sasagawa, N., Nishino, I., and Ishiura, S. (2011). Alternative splicing of myomesin 1 gene is aberrantly regulated in myotonic dystrophy type 1. *Genes Cells* *16*, 961-972.
- Kroksmark, A.K., Ekstrom, A.B., Bjorck, E., and Tulinius, M. (2005). Myotonic dystrophy: muscle involvement in relation to disease type and size of expanded CTG-repeat sequence. *Dev. Med. Child. Neurol.* *47*, 478-485.
- Kuyumcu-Martinez, N.M., Wang, G.S., and Cooper, T.A. (2007). Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol. Cell.* *28*, 68-78.
- Lin, X., Miller, J.W., Mankodi, A., Kanadia, R.N., Yuan, Y., Moxley, R.T., Swanson, M.S., and Thornton, C.A. (2006). Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 2087-2097.
- Llamusi, B., Bargiela, A., Fernandez-Costa, J.M., Garcia-Lopez, A., Klima, R., Feiguin, F., and Artero, R. (2012). Muscleblind, BSF and TBPH are mislocalized in the muscle sarcomere of a *Drosophila* myotonic dystrophy model. *Dis Model Mech* *6*, 184-196.
- Maroto, M., Arredondo, J., Goulding, D., Marco, R., Bullard, B., and Cervera, M. (1996). *Drosophila* paramyosin/miniparamyosin gene products show a large diversity in quantity, localization, and isoform pattern: a possible role in muscle maturation and function. *J. Cell. Biol.* *134*, 81-92.
- Marquis, J., Paillard, L., Audic, Y., Cosson, B., Danos, O., Le Bec, C., and Osborne, H.B. (2006). CUG-BP1/CELF1 requires UGU-rich sequences for high-affinity binding. *Biochem J* *400*, 291-301.
- Masuda, A., Andersen, H.S., Doktor, T.K., Okamoto, T., Ito, M., Andresen, B.S., and Ohno, K. (2012). CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci. Rep.* *2*, 209.
- Mientjies, E.J., Willemsen, R., Kirkpatrick, L.L., Nieuwenhuizen, I.M., Hoogeveen-Westerveld, M., Verweij, M., Reis, S., Bardoni, B., Hoogeveen, A.T., Oostra, B.A., et al. (2004). *Fxr1* knockout mice show a striated muscle phenotype: implications for *Fxr1p* function in vivo. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 1291-1302.
- Mooers, B.H., Logue, J.S., and Berglund, J.A. (2005). The structural basis of myotonic dystrophy from the crystal structure of CUG repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 16626-16631.
- Nagaso, H., Murata, T., Day, N., and Yokoyama, K.K. (2001). Simultaneous detection of RNA and protein by in situ hybridization and immunological staining. *J Histochem Cytochem* *49*, 1177-1182.
- 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.
- Philips, A.V., Timchenko, L.T., and Cooper, T.A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* *280*, 737-741.

- Picchio, L., Plantie, E., Renaud, Y., Poovthumkadavil, P., and Jagla, K. (2013). Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 2795-2810.
- Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C., Villemain, J.P., Fischer, M.C., Jost, B., Dembele, D., Gourdon, G., Nicole, A., Duboc, D., et al. (2011). Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 840-845.
- Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., and Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* *11*, 1114-1125.
- Rinaldi, F., Terracciano, C., Pisani, V., Massa, R., Loro, E., Vergani, L., Di Girolamo, S., Angelini, C., Gourdon, G., Novelli, G., et al. (2011). Aberrant splicing and expression of the non muscle myosin heavy-chain gene MYH14 in DM1 muscle tissues. *Neurobiol. Dis.* *45*, 264-271.
- Rubin, G.M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C.R., Hariharan, I.K., Fortini, M.E., Li, P.W., Apweiler, R., Fleischmann, W., et al. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* *287*, 2204-2215.
- Savkur, R.S., Philips, A.V., and Cooper, T.A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* *29*, 40-47.
- Shcherbata, H.R., Yatsenko, A.S., Patterson, L., Sood, V.D., Nudel, U., Yaffe, D., Baker, D., and Ruohola-Baker, H. (2007). Dissecting muscle and neuronal disorders in a *Drosophila* model of muscular dystrophy. *EMBO J* *26*, 481-493.
- Suzuki, H., Jin, Y., Otani, H., Yasuda, K., and Inoue, K. (2002). Regulation of alternative splicing of alpha-actinin transcript by Bruno-like proteins. *Genes Cells* *7*, 133-141.
- Taneja, K.L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., and Singer, R.H. (1995). Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J. Cell. Biol.* *128*, 995-1002.
- Timchenko, L.T., Salisbury, E., Wang, G.L., Nguyen, H., Albrecht, J.H., Hershey, J.W., and Timchenko, N.A. (2006). Age-specific CUGBP1-eIF2 complex increases translation of CCAAT/enhancer-binding protein beta in old liver. *J. Biol. Chem.* *281*, 32806-32819.
- 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.
- Tran, H., Gourrier, N., Lemerrier-Neuillet, C., Dhaenens, C.M., Vautrin, A., Fernandez-Gomez, F.J., Arandel, L., Carpentier, C., Obriot, H., Eddarkaoui, S., et al. (2011). Analysis of exonic regions involved in nuclear localization, splicing activity, and dimerization of Muscleblind-like-1 isoforms. *J. Biol. Chem.* *286*, 16435-16446.
- Vihola, A., Bachinski, L.L., Sirito, M., Olufemi, S.E., Hajibashi, S., Baggerly, K.A., Raheem, O., Haapasalo, H., Suominen, T., Holmlund-Hampf, J., et al. (2010). Differences in aberrant expression and splicing of sarcomeric proteins in the myotonic dystrophies DM1 and DM2. *Acta Neuropathol* *119*, 465-479.
- Vlasova, I.A., Tahoe, N.M., Fan, D., Larsson, O., Rattenbacher, B., Sternjohn, J.R., Vasdewani, J., Karypis, G., Reilly, C.S., Bitterman, P.B., et al. (2008). Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol. Cell.* *29*, 263-270.

- Wang, G.S., Kearney, D.L., De Biasi, M., Taffet, G., and Cooper, T.A. (2007). Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J. Clin. Invest.* 117, 2802-2811.
- Whitman, S.A., Cover, C., Yu, L., Nelson, D.L., Zarnescu, D.C., and Gregorio, C.C. (2011). Desmoplakin and talin2 are novel mRNA targets of fragile X-related protein-1 in cardiac muscle. *Circ Res* 109, 262-271.
- 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.
- Yamashita, Y., Matsuura, T., Shinmi, J., Amakusa, Y., Masuda, A., Ito, M., Kinoshita, M., Furuya, H., Abe, K., Ibi, T., et al. (2012). Four parameters increase the sensitivity and specificity of the exon array analysis and disclose 25 novel aberrantly spliced exons in myotonic dystrophy. *J Hum Genet* 57, 368-374.
- 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.
- Zarnescu, D.C., and Gregorio, C.C. (2013). Fragile hearts: New insights into translational control in cardiac muscle. *Trends Cardiovasc Med.*
- Zhang, L., Lee, J.E., Wilusz, J., and Wilusz, C.J. (2008). The RNA-binding protein CUGBP1 regulates stability of tumor necrosis factor mRNA in muscle cells: implications for myotonic dystrophy. *J. Biol. Chem.* 283, 22457-22463.

Tables

Table 1

Gene name	Biological process	Human orthologues
<i>Actn</i>	flight behavior; sarcomere organization; actin cytoskeleton reorganization	ACTN1 ACTN2 ACTN4
<i>bent</i>	sarcomere organization; mesoderm development	KRTAP6-1 ELN PHGR1 KRTAP5-5 DSCAM HMCN1 MYLK3 KRTAP5-8 NKX1-1 HMCN2 KRTAP5-1 CT47B1 DSCAML1 FOXD3 KRTAP5-4 BAG3 MARCKS MYLK2 TTN MYLK4
<i>Mhc</i>	muscle cell differentiation; actin filament-based process; localization; cellular component movement; flight	MYH15 MYH13 MYH2 MYH3 MYH1 MYH7 MYH8 MYH6 HMX3
<i>Mlc1</i>	mesoderm development	MYL6 MYL3 MYL1 MYL6 MYL4
<i>Mlc2</i>	muscle system process	MYL12B MYL10 MYL9 MYL2 MYL7 MRLC3
<i>Prm</i>	myofibril assembly; mesoderm development	MYH15
<i>Tm1</i>	muscle contraction	TPM1 TPM3 TPM4 TPM2
<i>Tm2</i>	heart development	TPM1 TPM3 TPM4 TPM2
<i>TpnC47D</i>	-	CALML6
<i>Unc-89</i>	adult somatic muscle development; sarcomere organization	SPEG OBSCN
<i>wupA</i>	heart development; myofibril assembly; skeletal muscle tissue development; nervous system development; muscle organ development; nuclear division; muscle cell homeostasis; sarcomere organization; cardiac muscle tissue development	TNNI3 TNNI2 TNNI1
<i>Zasp52</i>	myofibril assembly; muscle structure development	PDLIM1 PDLIM2 LDB3 PDLIM4 PDLIM3 PDLIM5 PDLIM7

Table 2. qPCR primers

Transcript	Fwd/Rev	5' to 3' sequence
gapdh	F	accactgccacccagaagac
	R	cttcaggggtcccttgagg
Rp49	F	gctcaagggacagtatctg
	R	aaacgcggttctgcatgag
Bru-3	F	ccgaaggtgagtttgctc
	R	cttcagctgtaaagcacgg
Actn	F	tacggagatggctacatgg
	R	aatggctgttacaccaggc
Bent	F	taccaattccgagttagagc
	R	gtagaccgatcgatttgcg
Mhc	F	gaagtgaaggtgcgcaagg
	R	ttggatatcgcgagctgg
Mlc1	F	cttcattgagtgcttgaagc
	R	atccaagctctaccaagc
Mlc2	F	ggttcgaagagagcgtcg
	R	gcatccatgagttggaagg
Prm	F	gtggagctcaagcatgtcg
	R	tggacaagttcttgacttcg
Tm1	F	acaaggacggagctctgg
	R	ctggatcttctctgcagc
Tm2	F	agttgggcatcaacaaggac
	R	atctcgtcgtcgtctccatc
TpnC47D	F	gaaatggtgccgatatcc
	R	accggatttgctctcatcg
unc-89	F	ccgtctcaagacgttctgc
	R	agtagttgagtaggggtagg
wupA	F	atctcaatgcccaagttaacg
	R	gcttggcgaatttgttttcg
Zasp52	F	ccaatgcttcaactgcag
	R	cgtgattcttgagaaggg

Figure Legends

Figure 1. Bru-3 is expressed in larval somatic muscles. (A) CUGBP1 sequence aligned with Bruno orthologues. Lms stands for linker specific motif. In red is represented the peptide designed to raise the antibody specifically against Bru-3. (B-E'') Bru-3 expression in SBM of 3rd instar larvae in *WT* (B-B'''), *Mef>960CTG* (C-C'''), *Mef>960CTG,df(bru-3)* (D-D'') and *Mef>bru-3RNAi* (E-E'') conditions. Co-immunostaining against Bru-3 (green), actinin (red) and lamin (blue) show that Bru-3 is expressed in larval somatic muscles more specifically in the sarcomeres as well as weakly in the nuclei. White arrows indicate Bru-3 expression around the nuclei in a dotted pattern. (G) Signal intensity profile of Bru-3 (green) and actinin (red) in the sarcomeres of normal and pathological lines. Sarcomeric Bru-3 is expressed from one side and another of the Z-line (H) q-PCR performed on *bru-3* gain of function lines indicates that *Mef>bru-3(37)* exhibit a 15-fold increase of *bru-3* transcripts whereas *Mef>bru-3(43)* exhibit a 5-fold increase compared with controls. (I-I'') Co-immunostaining against Bru-3 (green), actinin (red) and lamin (blue) in *Mef>bru-3* muscles shows that Bru-3 expression is increased mainly in the nuclei.

Figure 2- Bru-3 overexpression alters motility and participates to fiber splitting. (A) Righting assay. The graph represents the average time recorded for the larvae of each genotype to turn over. (B-C) Assessment of the overall muscle pattern and muscle abnormality quantification. (B) Z-stacks of *in vivo* scanning of the global muscle pattern carried out on third instar larvae segments A5-A7. Arrows point to splitting fibers and arrowheads to extra/missing fibers. (C) Graph recapitulating the frequency of each defect observed *in vivo* for each mutant line. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 vs. *Mef>lacZ*. ####*P*<0.001 *Mef>960CTG* vs. *Mef>960CTG,df(bru-3)*.

Figure 3- Bru-3 gain of function affects myoblast fusion process *in vivo* but not contractility. (A) The average length of abdominal VL3 fibers is significantly reduced in *Mef>bru-3(37)* and *Mef>bru-3(43)* lines together with *Mef>960CTG* and *Mef>960CT,df(bru-3)G* lines compared with controls (*Mef>lacZ* and corresponding transgenic control line). (B-C) Myoblast fusion defect in DM1 condition is Bru-3-dependent. (B) The average number of nuclei per abdominal VL3 fiber is significantly reduced in *Mef>bru-3* and *Mef>960CTG* lines and is rescued in *Mef>960CTG,df(bru-3)* condition. The number of nuclei is used as an indicator of the number of fusion events during myogenesis, which means that fusion is affected in the DM1 line in a Bru-3-dependent manner. (C) Images of abdominal VL3 fibers representative of altered condition (*Mef>bru-3(37)*) and rescued condition (*Mef>960CTG,df(bru-3)*). Nuclei were stained with antibody against Lamin (green) Actin was stained with phalloidin (grey). (D) Larval muscle growth was not affected in pathological contexts. The average number of sarcomeres along the VL3 fiber is represented for each genotype and represents an index of fiber growth. (E-F) Sarcomere shortening in DM1 condition is not Bru-3-dependent. (E) For each mutant line analyzed, the relative sarcomere

size presented on the graph takes into account the sarcomere size of its corresponding transgenic control. (F) Z-band profiles along VL3 fibers were assessed with phalloidin staining along a 100 μ M length. The distance measured between two peaks corresponds to the sarcomere size. Thus the greater the number of peaks present on the profiles, the more contracted is the muscle. (F) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. both *Mef>lacZ* and respective transgenic control line.

Figure 4. 80-90% of transcriptomic alterations caused by Bru-3 overexpression are common with DM1 and/or mbl attenuated lines. Venn-diagrams of down- (A) and up- (B) regulated genes in *Mef>bru-3(37)* condition vs. *Mef>mblRNAi* and DM1 (*Mef>960CTG* \cap *Mef>600CTG*) lines. The diagram was generated from a list of transcripts that are >1.5-fold enriched or depleted, relative to the *Mef>lacZ* reference.

Figure 5. Genome-wide approach and FISH reveal that sarcomere component transcripts are targets of Bru-3. (A) Volcano plot summarizing microarray data for the *Mef>bru-3(37)* line vs. *Mef>lacZ*. The horizontal axis represents the fold-change on a log-2 scale. The vertical axis shows the p-value on a $-\log_{10}$ scale. Grey dots indicate probes below the threshold. Green dots represent probes with significant altered expression. Black dots indicate downregulated sarcomere component probes. (B-C) Pie chart recapitulating the Gene Ontology based biological process distribution of down- (B) and up- (C) regulated genes on *Mef>bru-3(37)* microarray. Genes with unknown biological process and molecular function were not taken into account in these charts ($n_{down} = 101$; $n_{up} = 99$). (D) Validation of candidate genes by RT-qPCR among the cytoskeleton and sarcomere group. (E) FISH followed by immunostaining show that Bru-3 (green) colocalizes with *mhc-1* or *actn* transcripts (red) in dots around the nuclei visualized with DAPI (blue).

Figure 6. Mhc and Actn proteins are mislocalized in sarcomere. (A, D, G) Mhc immunostaining (red) and actin stained with phalloidin (blue) show that Mhc is ectopically expressed in the I-band in *Mef>bru-3(37)* (D) and *Mef>960CTG* conditions (G). (B, E, H) Prm (green) and Tm2 (red) co-immunostainings are normal in pathological conditions. (C, F, I) Zasp52 (green) and α -actinin (red) co-immunostaining show that Bru-3 overexpression mislocalizes α -actinin in the A-band (F).

Figure 7. Representation of Bru-3 involvement in the translation/co-translational assembly model. Sarcomere components transcripts are exported to the sarcoplasm where they are taken in charge by Bru-3. Bru-3 distributes the transcripts in the sarcomeres at the same time it regulates their stability. Once on the site where sarcomere protein is required, Bru-3 associates with ribosomes to allow mRNA translation into sarcomeric proteins.

Supplemental Material 1. AU-rich elements (underlined) and UGU motifs (highlighted) of 3' non-translated region of targeted transcripts.

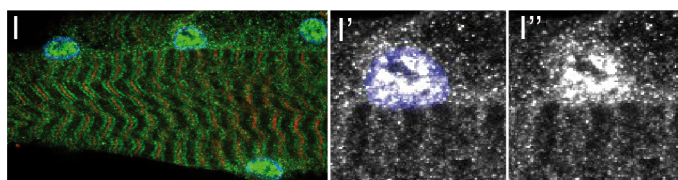
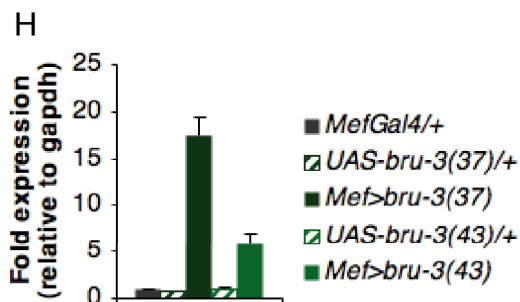
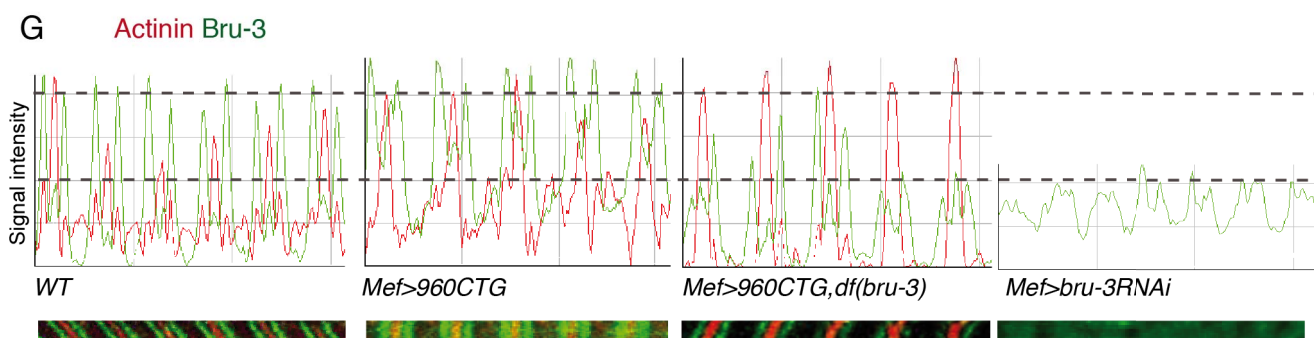
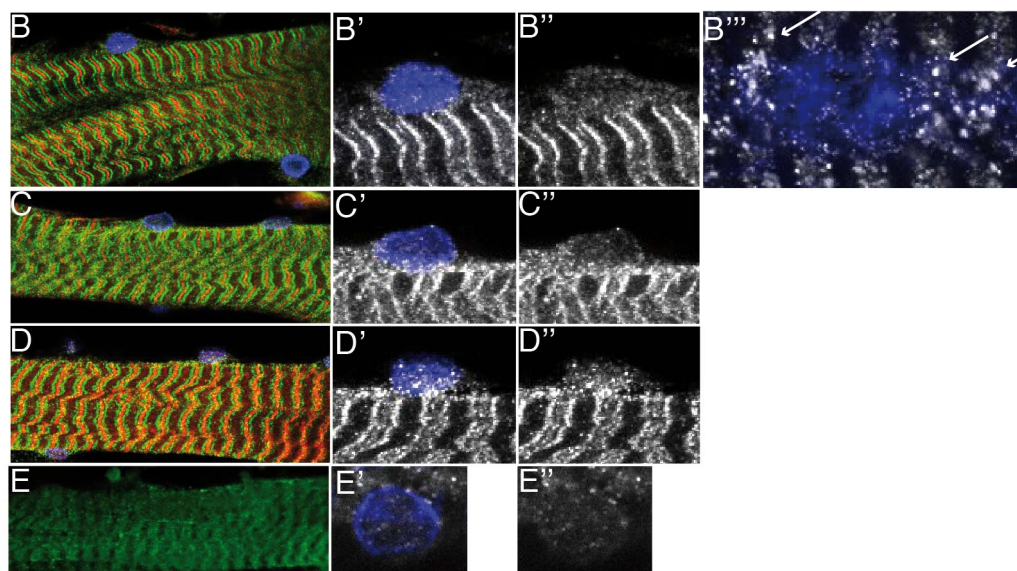
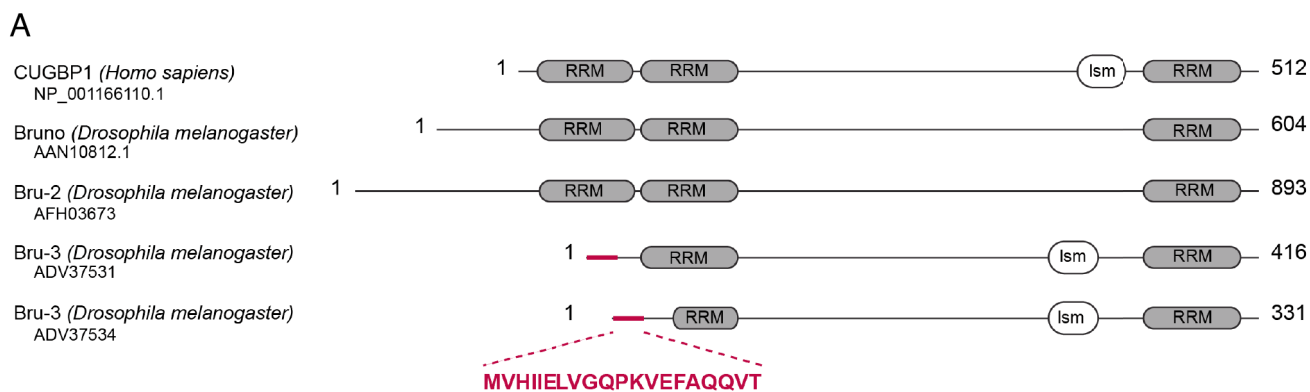


Figure 1.

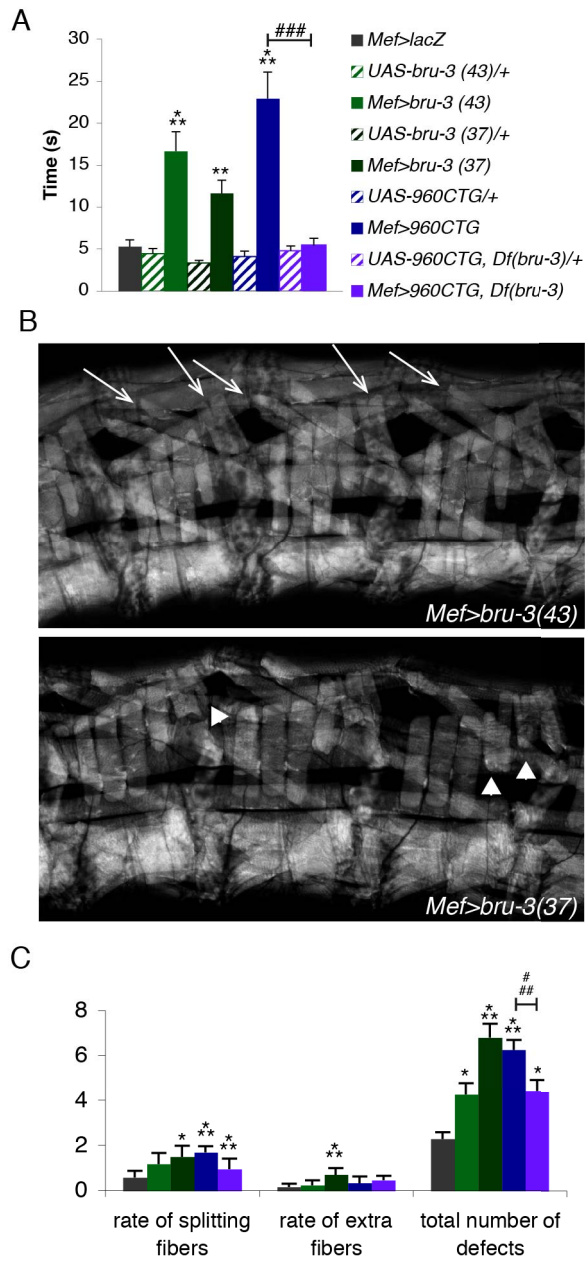


Figure 2.

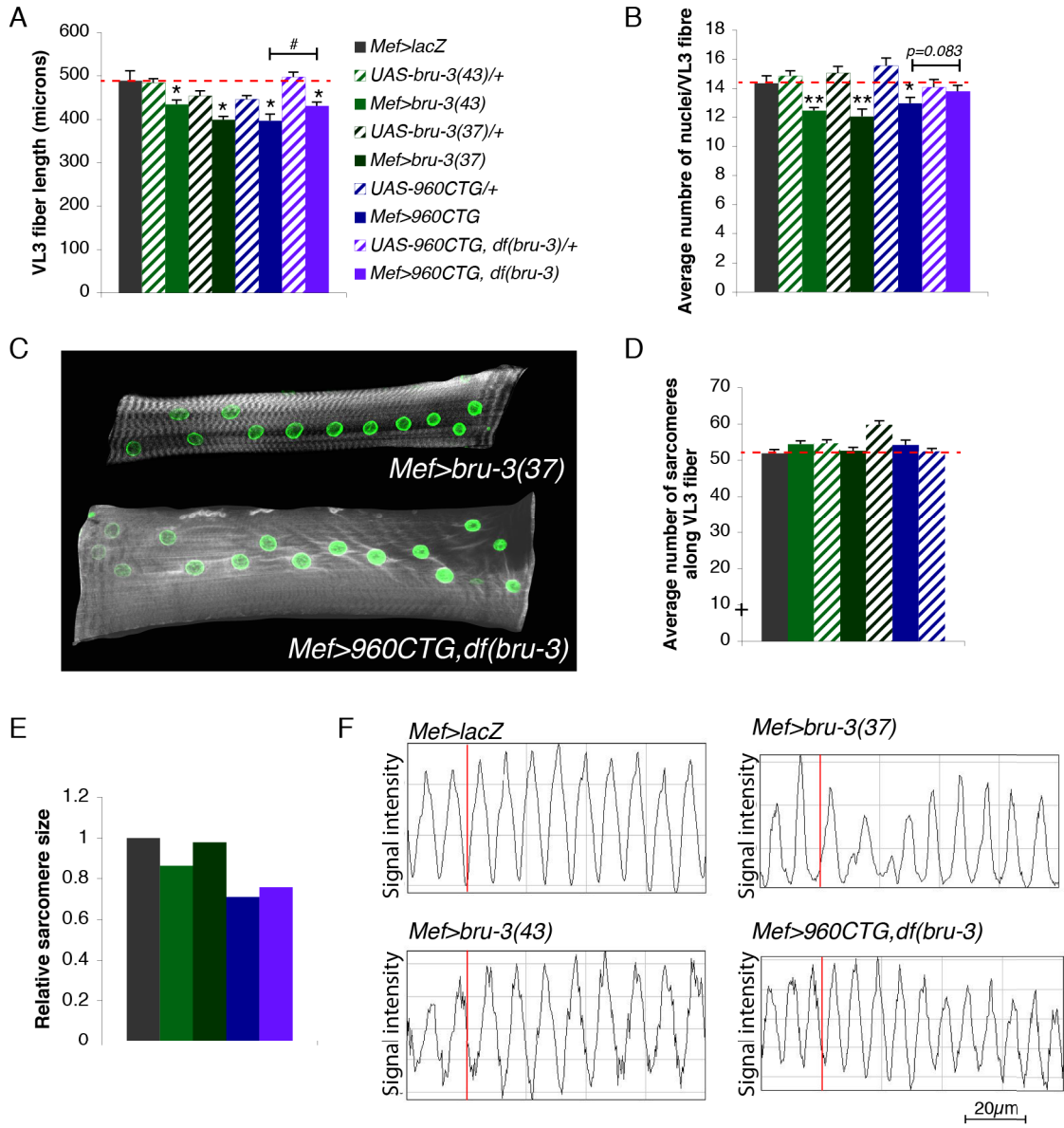
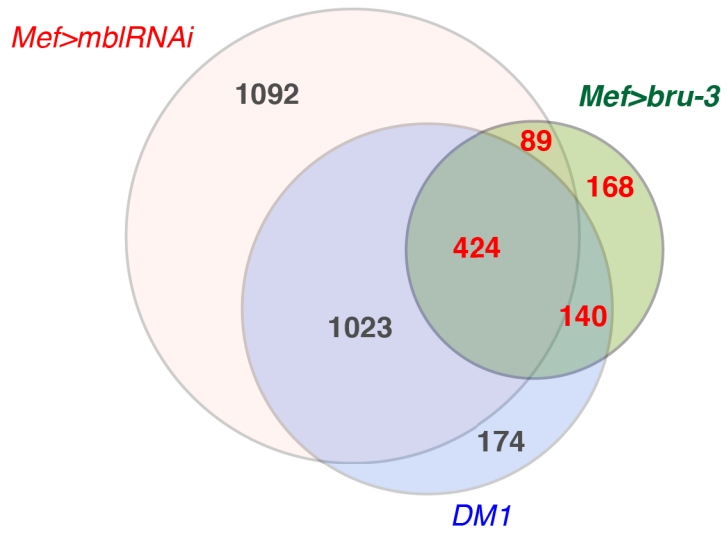


Figure 3.

Down-regulated genes



Up-regulated genes

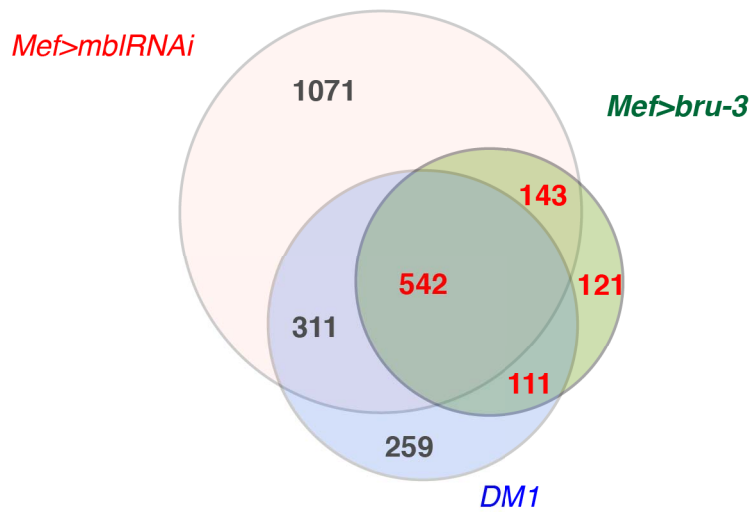


Figure 4

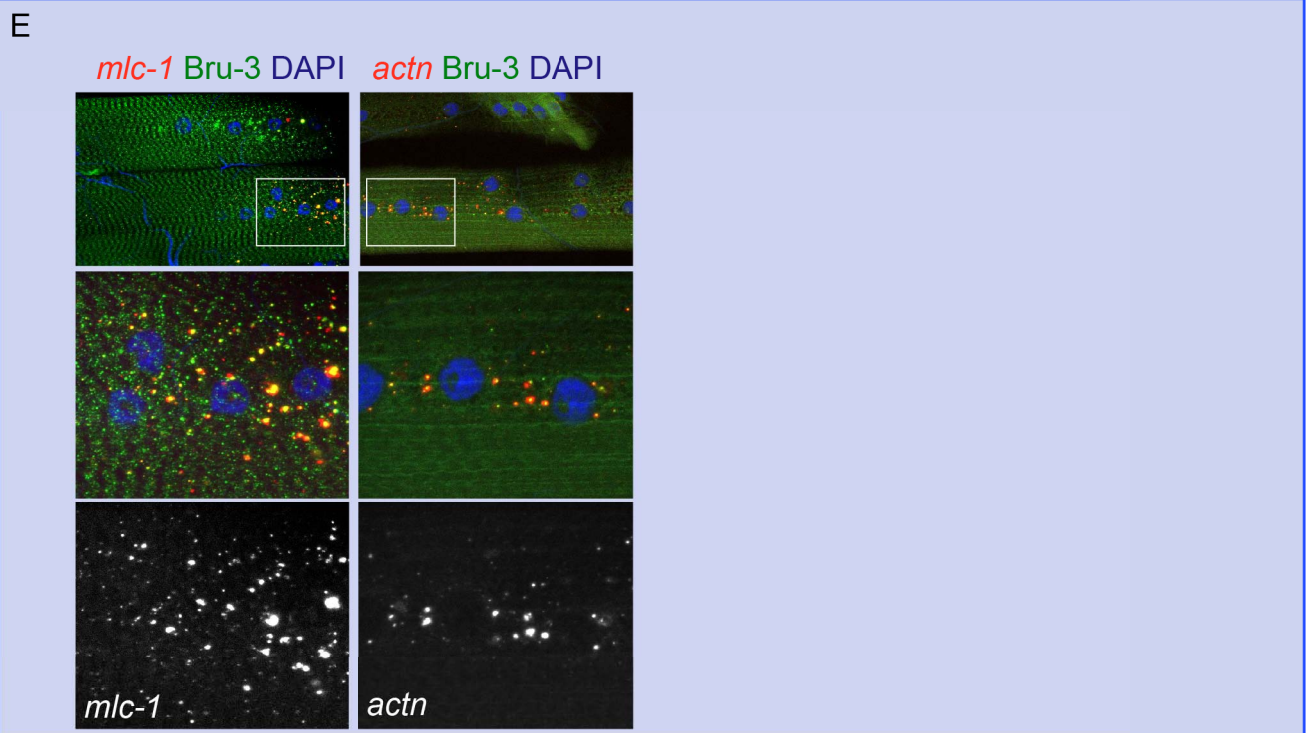
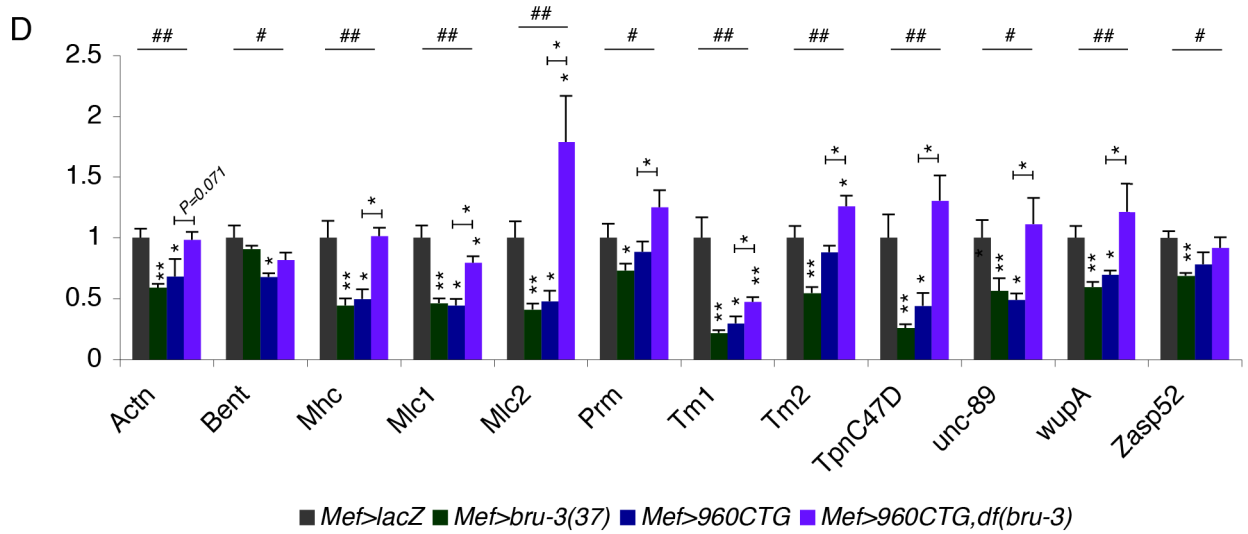
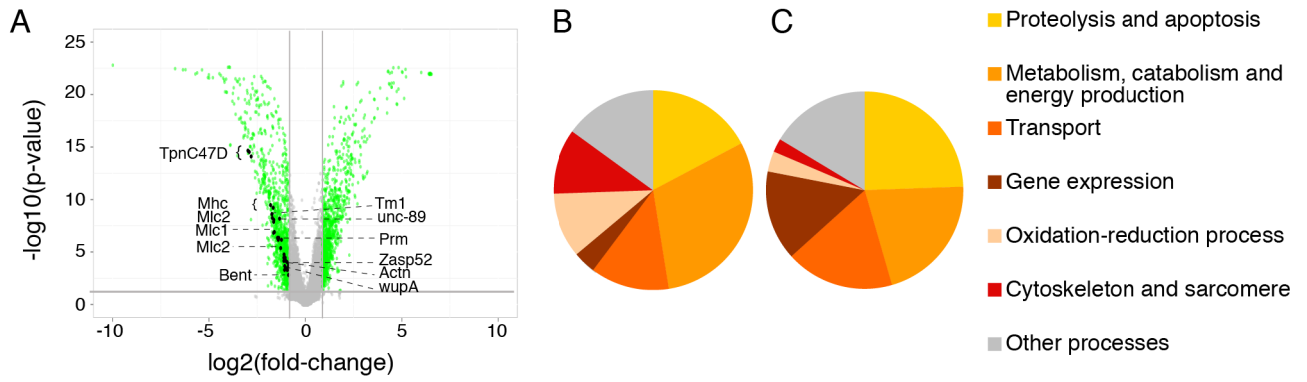


Figure 5

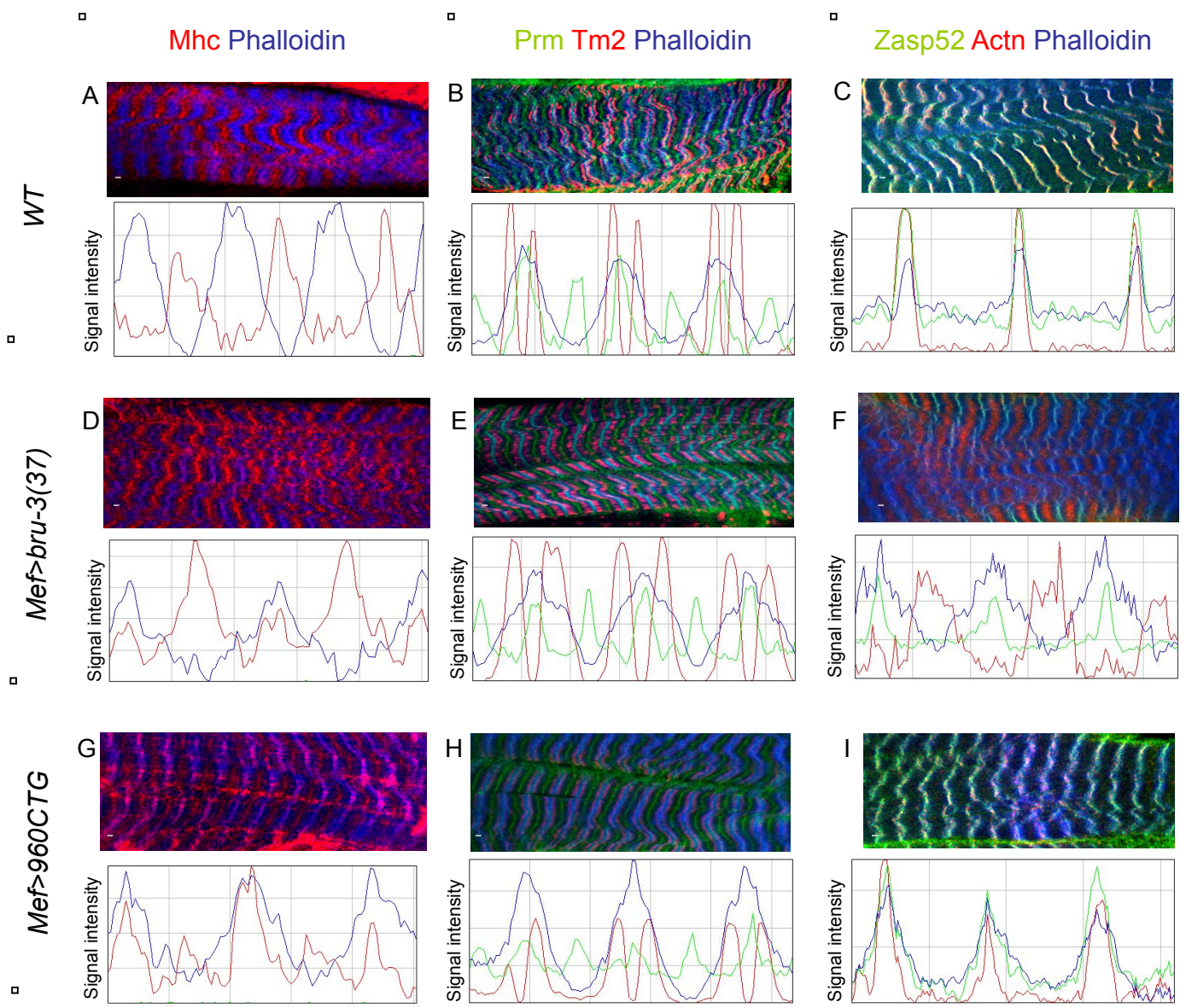


Figure 6

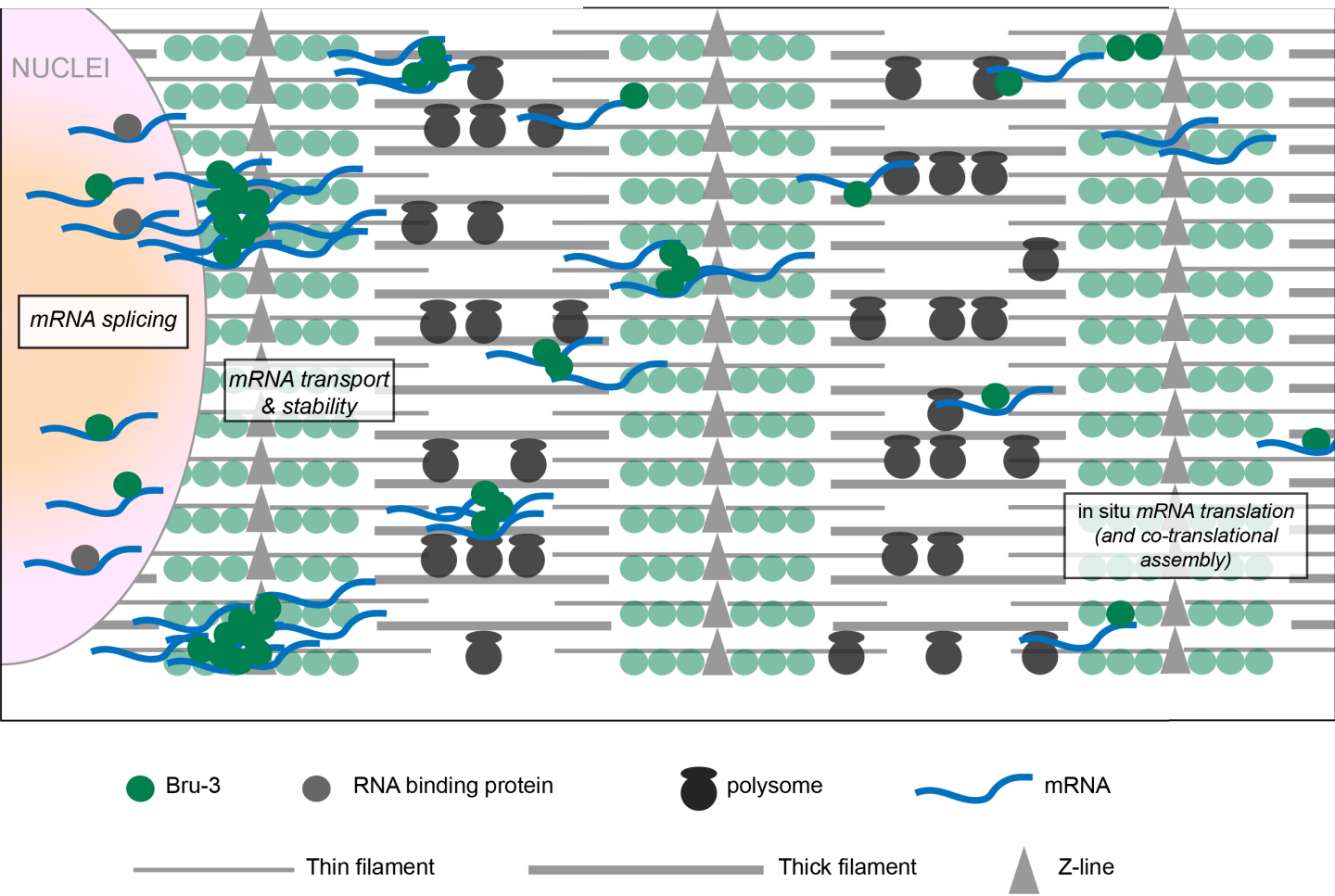


Figure 7

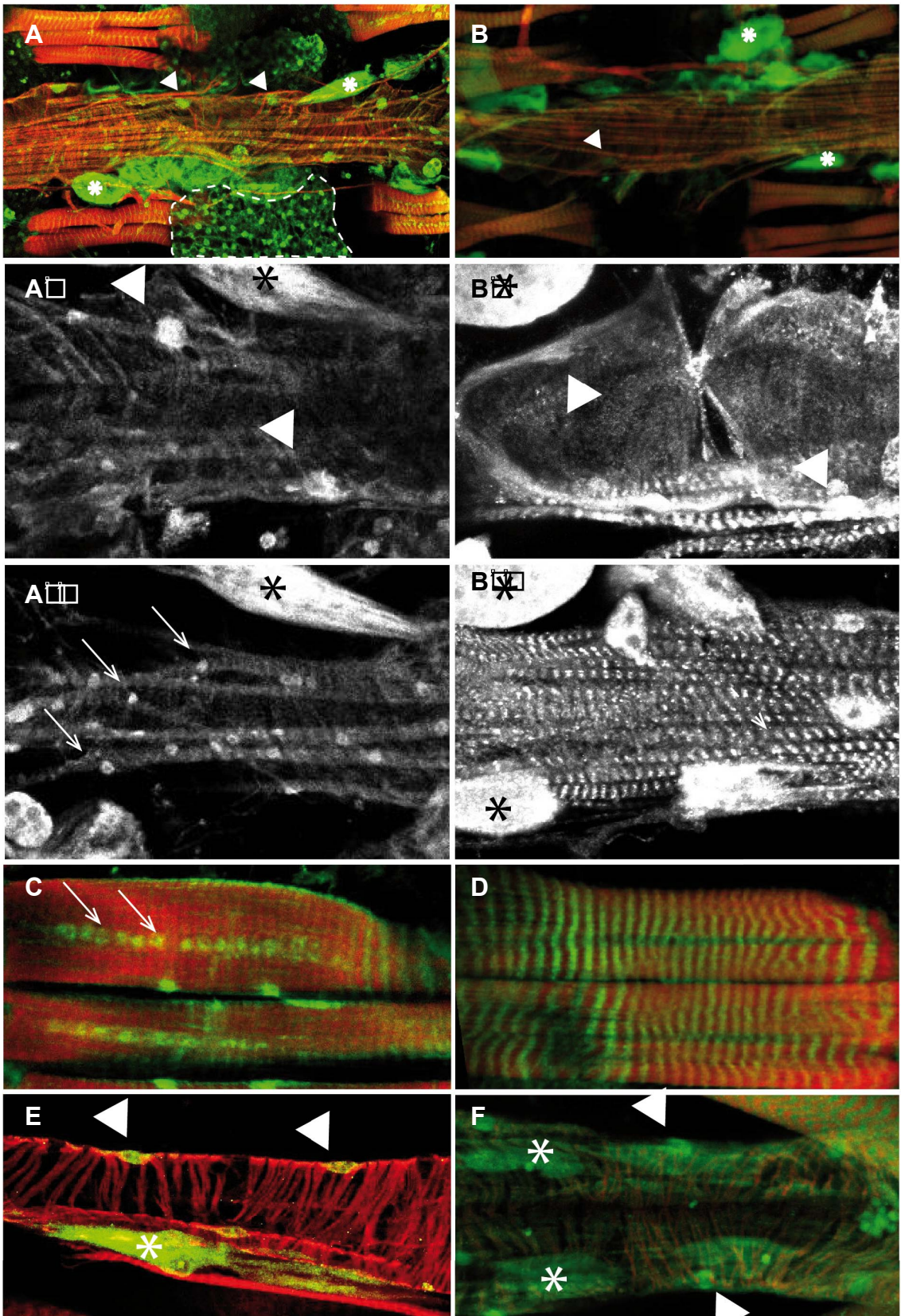
Mbl actin**Bru-3 actin**

Figure 52. Expression de Mbl et Bru-3 dans le tube cardiaque et le muscle somatique adulte

Tube cardiaque adulte (A-A'') et larvaire (E) immunomarcu  avec Mbl. Mbl est exprimé dans les noyaux des cardioblastes indiqués par une tête de flèche (A'-E) et les noyaux des fibres longitudinales indiqués par des flèche (A''). Les cellules péricardiaques sont indiquées par une astérisque. Tube cardiaque adulte (B-B'') et larvaire (F) immunomarcu  avec Bru-3. Bru-3 est exprimé dans les noyaux des cardioblastes indiqués par une tête de flèche (B'-F) ainsi que dans les sarcomères des fibres longitudinales et circulaires (B-B''; E). C-D) Muscles somatiques adultes de la paroi abdominale. Mbl est exprimé dans les noyaux et les sarcomères des muscles adultes (C) alors que Bru-3 est bien présent dans les sarcomères (D).

III. Analyse physiologique des phénotypes cardiaques des *Drosophiles* adultes modèles de DM1

Alors que le muscle squelettique/somatique est très étudié dans les modèles animaux de la DM1, le muscle cardiaque est plus « négligé » à cause de la létalité engendrée par l'expression de la mutation dans le cœur. En tout état de cause, seul le laboratoire de Thomas Cooper a caractérisé les phénotypes cardiaques des lignées EpA960 qui décèdent dans les deux semaines qui suivent l'induction du transgène dans le muscle cardiaque (Wang *et al.*, 2007).

Nous avons vu précédemment que Mbl et Bru-3 sont exprimés dans le muscle somatique larvaire et qu'ils contribuent, avec des degrés différents, aux phénotypes observés dans les lignées DM1 de *Drosophile*. La mouche étant un bon modèle d'étude des maladies cardiaques dégénératives (Ocorr *et al.*, 2007; Taghli-Lamalle *et al.*, 2008) nous avons tiré profit de notre modèle pour tenter de répondre aux interrogations suivantes :

- 1) Mbl et Bru-3 sont-ils exprimés dans le tube cardiaque de la *Drosophile* ? Quelle est leur contribution respective aux phénotypes cardiaques des lignées DM1 ?
- 2) Les phénotypes cardiaques des lignées DM1 sont-ils évolutifs dans le temps ?
- 3) *dSERCA* dont l'épissage est dérégulé dans les muscles somatiques intervient-il dans les phénotypes cardiaques ?

1. Résultats

1.1. Expression de Mbl et Bru-3 dans le cœur et le muscle adulte

Un immunomarquage avec l'anticorps anti-Mbl des tubes cardiaques adulte et larvaire montre que Mbl est exprimé dans les noyaux des cardioblastes (Figure 52 A, A' et E) ainsi que dans les noyaux des fibres longitudinales (Figure 52A, A''). Mbl est également détecté plus faiblement dans le cytoplasme des fibres circulaires et longitudinales du cœur (Figure 52A'-A''). Dans les muscles somatiques adultes de la paroi abdominale, Mbl est exprimé fortement dans les noyaux et plus faiblement dans les sarcomères (Figure a52A et C). Mbl est également observable dans les cellules PC et les cellules adypocytaires (Figure 52A et E). Ainsi Mbl est exprimé dans le cœur dès les stades larvaires et son expression ne semble pas limitée aux tissus musculaires. Bien que plus fortement détectée dans les

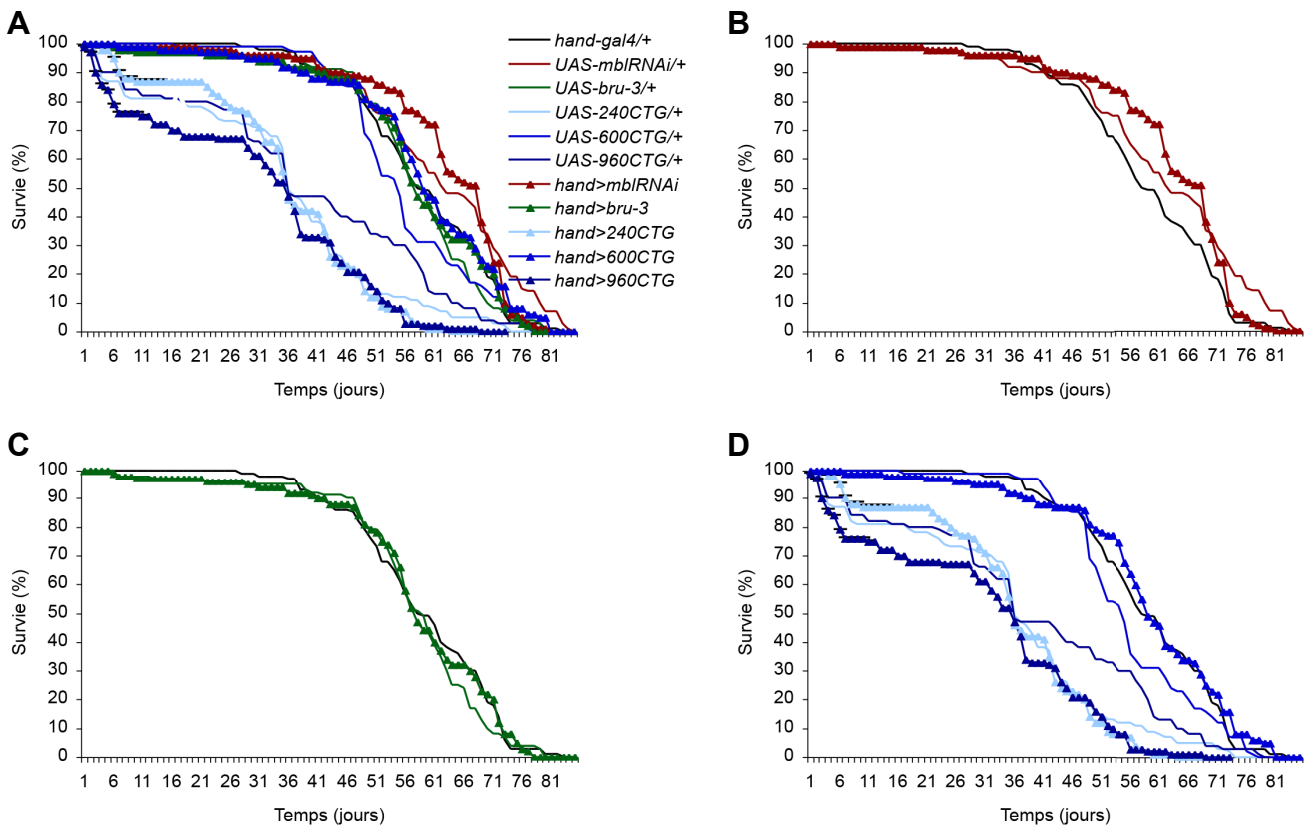


Figure 53. Survie des lignées DM1 induites avec le pilote cardiaque *Hand-gal4*

A) Vue d'ensemble de la survie de l'ensemble des lignées. B) Survie de la lignée atténuée pour *mbl* et des lignées contrôles. C) Survie de la lignée gain de fonction *bru-3* et des lignées contrôles. D) Survies des lignées exprimant 240, 600 ou 960 répétitions CTG et des lignées contrôles.

noyaux, la protéine semble également avoir une expression cytoplasmique dans les sarcomères conformément à ce qui a été observé dans les muscles de vol (Llamusi *et al.*, 2012).

L'immunomarquage avec l'anticorps anti-Bru-3 révèle une expression cytoplasmique importante de Bru-3 dans les fibres longitudinales et circulaires du cœur (Figure 52B', B'' et F). Bru-3 est détecté dans les noyaux des cardioblastes (Figure 52B'et F), les cellules PC (Figure 52B et B' et F) et les sarcomères des muscles somatiques de la paroi abdominale (Figure 52B et D). Ainsi contrairement à Mbl, Bru-3 semble plus présent dans le cytoplasme au niveau des sarcomères que dans le noyau. Néanmoins son expression dans les noyaux des cardioblastes est visible dès le stade larvaire.

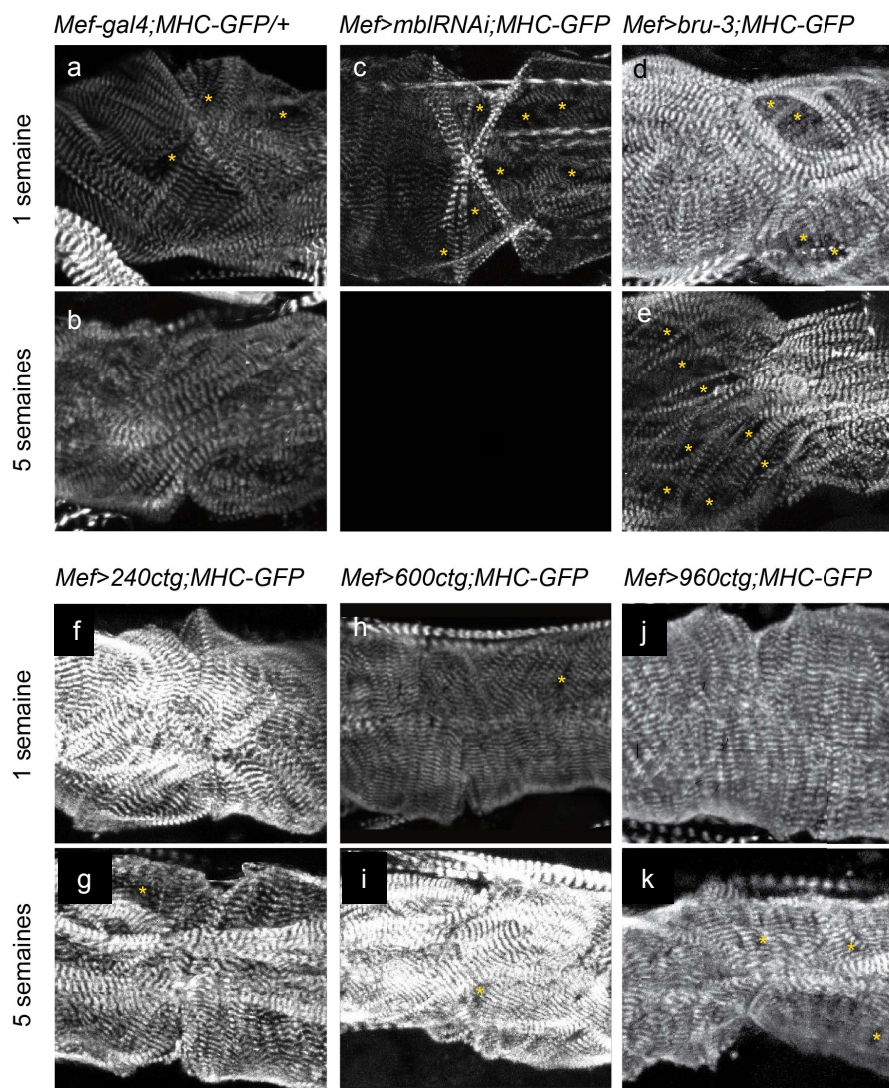
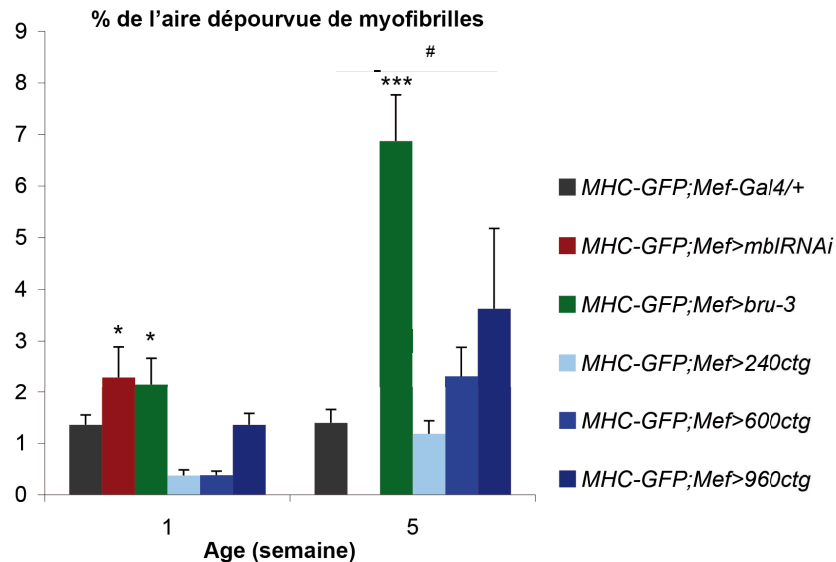
1.2. L'expression des transgènes dans le cœur n'affecte pas spécifiquement la survie des lignées pathologiques

Le pilote *Mef-Gal4* permet d'induire l'expression des transgènes dans les muscles somatiques et cardiaque. Cependant, la létalité de la lignée *Mef>mbIRNAi* au cours de la première semaine de vie adulte (voir Résultats 1.3.2.) nous a poussé à utiliser le pilote cardiaque *Hand-Gal4* afin de pouvoir suivre l'évolution dans le temps des phénotypes cardiaques. En effet, l'atténuation spécifiquement dans le cœur de *mbl* confère à cette lignée une survie moyenne d'environ 10 semaines (Figure 53B). De même les lignées *Hand>bru-3* (Figure 53C) et *Hand>600CTG* (Figure 53D) ont une survie similaire aux lignées contrôle du pilote *Hand-Gal4/+* et contrôles du transgène *UAS-bru-3/+* et *UAS-600CTG/+*. En revanche, de manière inattendue, les lignées *Hand>960CTG*, *UAS-960CTG/+*, *Hand>240CTG* et *UAS-240CTG/+* meurent plus précocement (Figure 53D), probablement à cause de l'insertion du transgène qui est pourtant identique à celle des lignées *UAS-600CTG/+* et *Hand>600CTG*.

1.3. Analyse structurale du cœur

Nous avons évalué la structure du cœur grâce à un transgène exprimant la chaîne lourde de myosine fusionnée à la GFP (MHC-GFP). La myosine révèle l'arrangement régulier des myofibrilles circulaires des mouches contrôles (*MHC-GFP ; Mef-Gal4/+*) âgées de 1 semaine (Figure 54Aa). Les cœurs plus âgés de 5 semaines présentent une désorganisation du parallélisme des myofibrilles (Figure 54Ab). De manière surprenante, les lignées DM1 âgées de 1 et 5 semaines présentent une bonne organisation des myofibrilles (Figure 54Af-k). Au contraire, les lignées atténuées pour *mbl* et gain de fonction *bru-3* présentent une forte désorganisation des myofibrilles qui semblent former un réseau plus lâche dès la première semaine (Figure 54Ac-e).

Pour 6-8 cœurs, l'aire dépourvue de myofibrille a été mesurée grâce au logiciel Fiji. Pour chaque image, la somme des aires dépourvues de myofibrilles a été rapportée à l'aire

A**B****Figure 54. Altération du réseau des myofibrilles circulaires**

A) Structure cardiaque des différentes lignées à 1 et 5 semaines. Images confocales représentatives des cœurs (segment postérieur A2-antérieur A3) exprimant MHC fusionnée à la GFP. Les astérisques jaunes indiquent les zones dépourvues de myofibrilles circulaires. B) Représentation graphique de la quantification par âge du pourcentage de la surface du cœur dépourvue de myofibrille. # $p < 0.05$ 1 semaine vs. 5 semaines. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. Contrôle (*MHC-GFP;Mef-Gal4/+*).

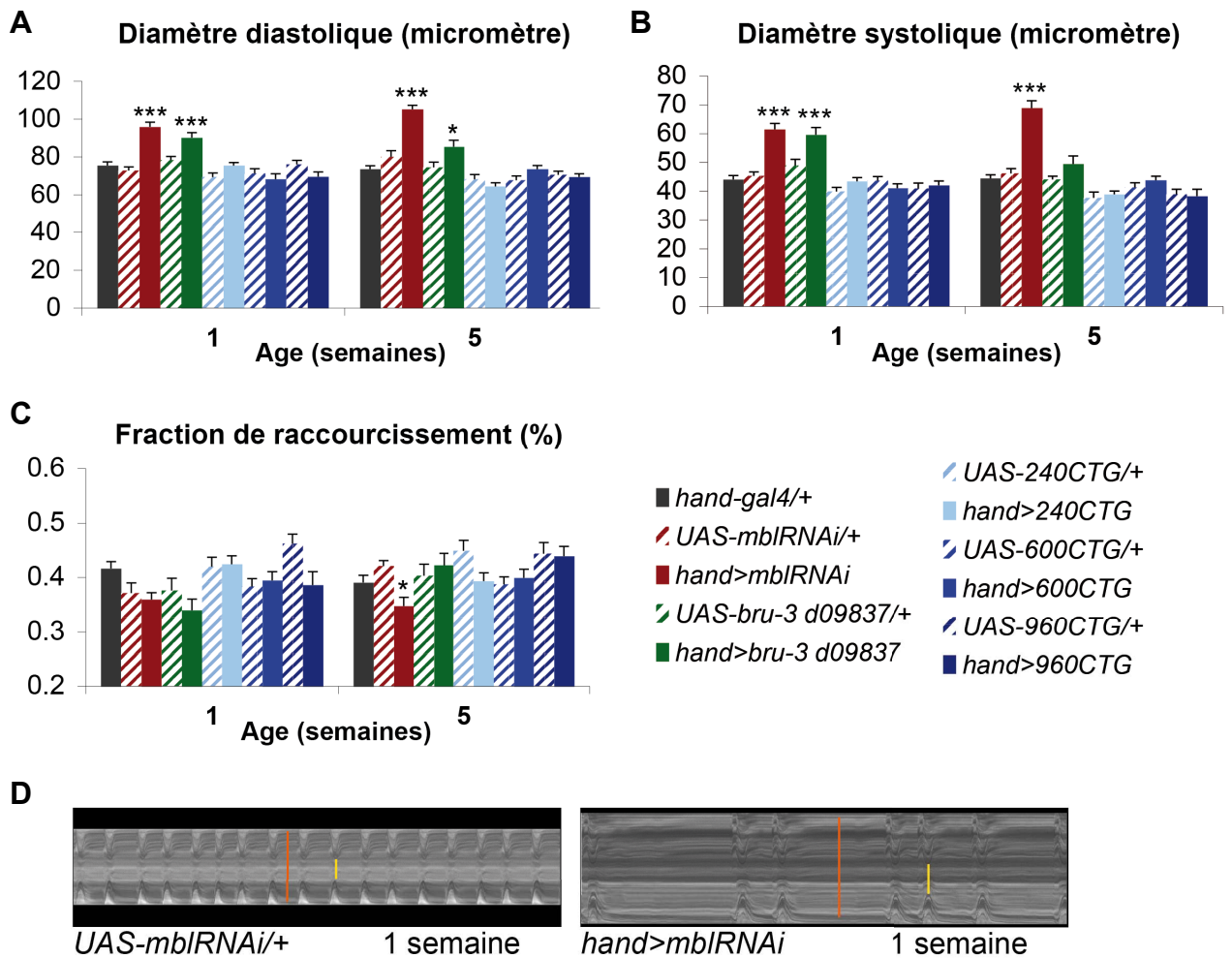


Figure 55. Paramètres contractiles de la fonction cardiaque des lignées DM1

A) Diamètre diastolique (en relaxation) des cœurs des lignées pathologiques. Les lignées *Hand>mbIRNAi* et gain de fonction *bru-3* (*Hand>bru-3*) présentent une augmentation significative du diamètre diastolique. B) Diamètre systolique (en contraction) des cœurs des lignées pathologiques. Les lignées *Hand>mbIRNAi* et gain de fonction *bru-3* (*Hand>bru-3*) présentent une augmentation significative du diamètre systolique à 1 semaine et à 5 semaines pour *Hand>mbIRNAi*. C) La fraction de raccourcissement témoin de la capacité du cœur à pomper est diminuée significativement à 5 semaines en contexte *Hand>mbIRNAi*. D) M-modes présentant la fréquence cardiaque régulière d'une mouche contrôlée (*UAS-mbIRNAi/+*) et la fréquence cardiaque irrégulière d'une mouche atténuée pour *mbi* (*Hand>mbIRNAi*). Le diamètre diastolique est représenté par une barre orange et le diamètre systolique par une barre jaune pour chacune de ces conditions. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. Contrôle (*Hand-gal4/+*).

de la surface totale. Le pourcentage d'aire du myocarde dépourvu de myofibrille est significativement plus élevé dans les lignées *Mef>mbIRNAi* et *Mef>bru-3* la première semaine (Figure 54B). Ce pourcentage augmente significativement à 5 semaines où il est sept fois plus élevé dans la lignée gain de fonction *bru-3* par rapport à la lignée contrôle. Pour l'ensemble des lignées DM1 exprimant les répétitions non codantes, il y a une augmentation significative du pourcentage de l'aire dépourvue de myofibrille avec l'âge mais qui reste proche de celle du contrôle. Ainsi, ces données suggèrent que Mbl et Bru-3 sont requis pour l'intégrité structurale du cœur au cours de la vie adulte. En revanche, leur effet est contrebalancé dans les lignées DM1 suggérant l'implication d'autres facteurs dans ces lignées.

1.4. Analyse physiologique du cœur

Pour étudier la fonction cardiaque nous avons disséqué des adultes femelles et réalisé des films de contraction cardiaque sur les cœurs plongés dans de l'hémolymphe artificielle (Ocorr *et al.*, 2007). L'analyse des films par le programme SOHA (Semi-automated Optical Heartbeat Analysis) mis au point sur le logiciel Matlab (Ocorr *et al.*, 2009) permet d'obtenir les paramètres contractiles et rythmiques des cœurs. Pour plus de précisions, se référer au matériel et méthodes.

1.4.1. Analyse des paramètres contractiles

Le diamètre diastolique (DD) moyen (diamètre du cœur relâché) des lignées contrôles et DM1 (*Hand>nnnCTG*) est $\sim 75 \mu\text{M}$ (Figure 55A) et le diamètre systolique (DS) moyen (diamètre du cœur en contraction) de ces mêmes lignées est $\sim 40 \mu\text{M}$ à 1 et 5 semaines. En revanche, le DD des lignées *Hand>mbIRNAi* et *Hand>bru-3* est significativement augmenté ($>90 \mu\text{M}$). Le DS est également significativement augmenté pour ces deux lignées à $60 \mu\text{M}$ la première semaine. Cependant, à la cinquième semaine, le DS de la lignée *Hand>mbIRNAi* est davantage élargi ($\sim 70 \mu\text{M}$) alors que celui de la lignée *Hand>bru-3* est rétabli par rapport aux lignées contrôles (Figure 55B). La fraction de raccourcissement (FR) reflète la capacité du cœur à pomper. Elle est définie selon la formule suivante : $FR = [(DD-DS)/DD] \times 100$. Seule la FR de la lignée *Hand>mbIRNAi* est significativement diminuée à 5 semaines (Figure 55C). L'augmentation des diamètres diastoliques et systoliques (Figure 55D) et la réduction à 5 semaines de la FR suggèrent que la lignée *Hand>mbIRNAi* développe avec l'âge une cardiomyopathie dilatée (CMD). La lignée *Hand>bru-3* quant à elle présente une simple dilatation principalement du DD. De manière intéressante, la dilatation des cœurs de ces deux lignées est associée à un réseau de myofibrilles circulaires plus lâche (Figure 54). On ne peut cependant conclure si c'est la fonction cardiaque qui altère la structure du cœur ou si c'est la désorganisation du réseau de myofibrilles qui affecte les diamètres cardiaques.

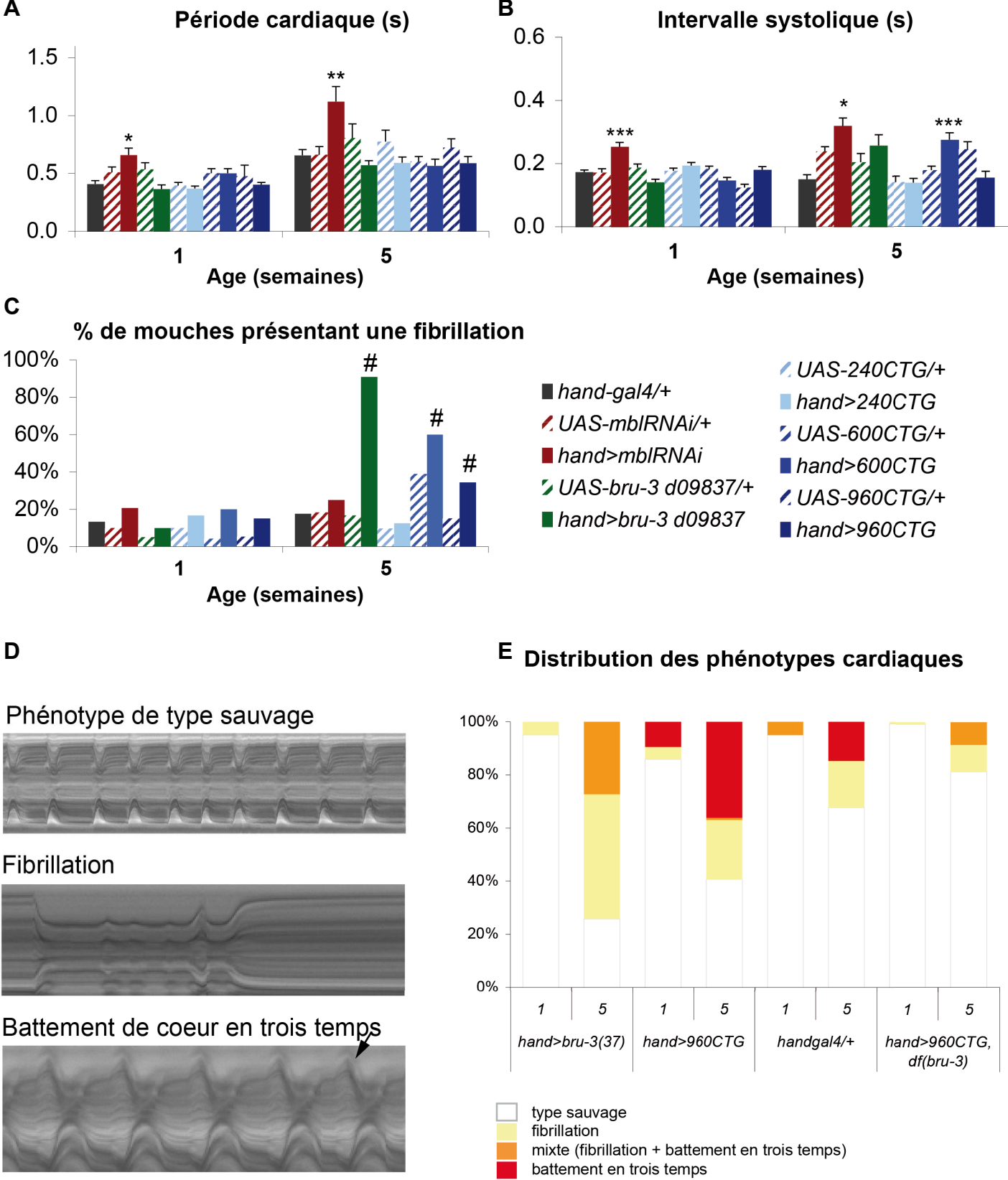


Figure 56. Paramètres rythmiques de la fonction cardiaque des lignées DM1

A) Période cardiaque. B) Intervalle systolique (temps de contraction). C) Proportion de mouches dont le cœur fibrille. # indique les points intéressants. D) M-modes représentant les différents phénotypes cardiaques des mouches DM1₉₆₀. La flèche pointe la dilatation télédiastolique responsable du troisième temps dans le battement cardiaque. E) Distribution des différents phénotypes cardiaques des mouches des lignées pathologiques *Hand>bru-3(37)*, *Hand>960CTG* et du contrôle de la lignée driver. La distribution des phénotypes des lignées pathologiques dans le temps prend en compte l'effet de l'insertion du transgène * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. Contrôle (*Hand-gal4/+*).

1.4.2. Analyse des paramètres rythmiques

La période cardiaque détermine le temps de contraction (intervalle systolique (IS)) et de dilatation du cœur (intervalle diastolique (ID)). Sur l'ensemble des lignées analysées, seule la période cardiaque de la lignée *Hand>mbIRNAi* est significativement augmentée par rapport aux lignées contrôles à 1 et 5 semaines (Figure 56A). Ce ralentissement du rythme cardiaque est dû à une augmentation de l'ID (non montré) et de l'IS (Figure 56B). De façon surprenante, la lignée *Hand>600CTG* présente à 5 semaines une augmentation significative de l'IS qui n'a pas de répercussion sur la période cardiaque (Figure 56A-B). Cela se traduit pour la lignée *Hand>600CTG* par une augmentation du pourcentage de mouches avec de la fibrillation à 5 semaines (Figure 56C), un IS>0.5 sec étant un critère de fibrillation dans le logiciel d'analyse des films. Le pourcentage de mouches qui fibrillent est très important dans la lignée *Hand>bru-3* et légèrement augmenté dans la lignée *Hand>960CTG* (Figure 56C). Nous nous attendions à ce qu'avec l'augmentation de la taille des répétitions CTG, le nombre de mouches présentant de la fibrillation soit plus important. Nous avons donc été surpris de constater que la lignée *Hand>960CTG* présentât moins de fibrillation que la lignée *Hand>600CTG*.

Cependant, lorsque joués au ralenti pour analyse, les films de la lignée *Hand>960CTG* nous ont permis de visualiser un phénotype particulier qui n'était pas pris en compte par le logiciel : le battement de cœur en trois temps. Le battement de cœur en trois temps est composé d'une phase de dilatation, d'une dilatation télédiastolique et d'une phase de contraction. La dilatation télédiastolique se traduit visuellement par une dilatation brève et encore plus importante du cœur juste avant la contraction. Ainsi, les lignées *Hand>960CTG* présentent 3 grands types de phénotypes récapitulés dans la Figure 56D : un phénotype de type sauvage, de la fibrillation et un battement de cœur en trois temps. Certaines mouches présentent des événements ponctuels de battement en trois temps associés à de la fibrillation. Une distribution de l'ensemble de ces phénotypes en fonction de l'âge (Figure 56F) montre que : (i) les coeurs *Hand>bru-3* présentent surtout de la fibrillation parfois associée à des événements de battements en trois temps (ii) la lignée *Hand>960CTG* présente un peu de fibrillation mais surtout des phénotypes de battement en trois temps et (iii) quelque soit le phénotype, le pourcentage de mouches affectées croît avec l'âge. Ainsi, les lignées DM1 présentent de la fibrillation qui semble évoluer dans le temps et/ou avec le nombre de répétitions vers un phénotype de battement en trois temps. Ce phénotype étant également retrouvé dans la lignée *Hand>bru-3* bien que dans une moindre mesure, nous nous sommes demandés si ce facteur pouvait participer aux phénotypes cardiaques de la lignée DM1. Nous avons donc établi la distribution des phénotypes rythmiques de la lignée *Hand>960CTG,df(bru-3)* qui présente une délétion hétérozygote de *bru-3*. Étrangement, la déficience en *bru-3* réduit énormément la proportion de mouches avec des phénotypes cardiaques (Figure 56F), plus que selon nos attentes.

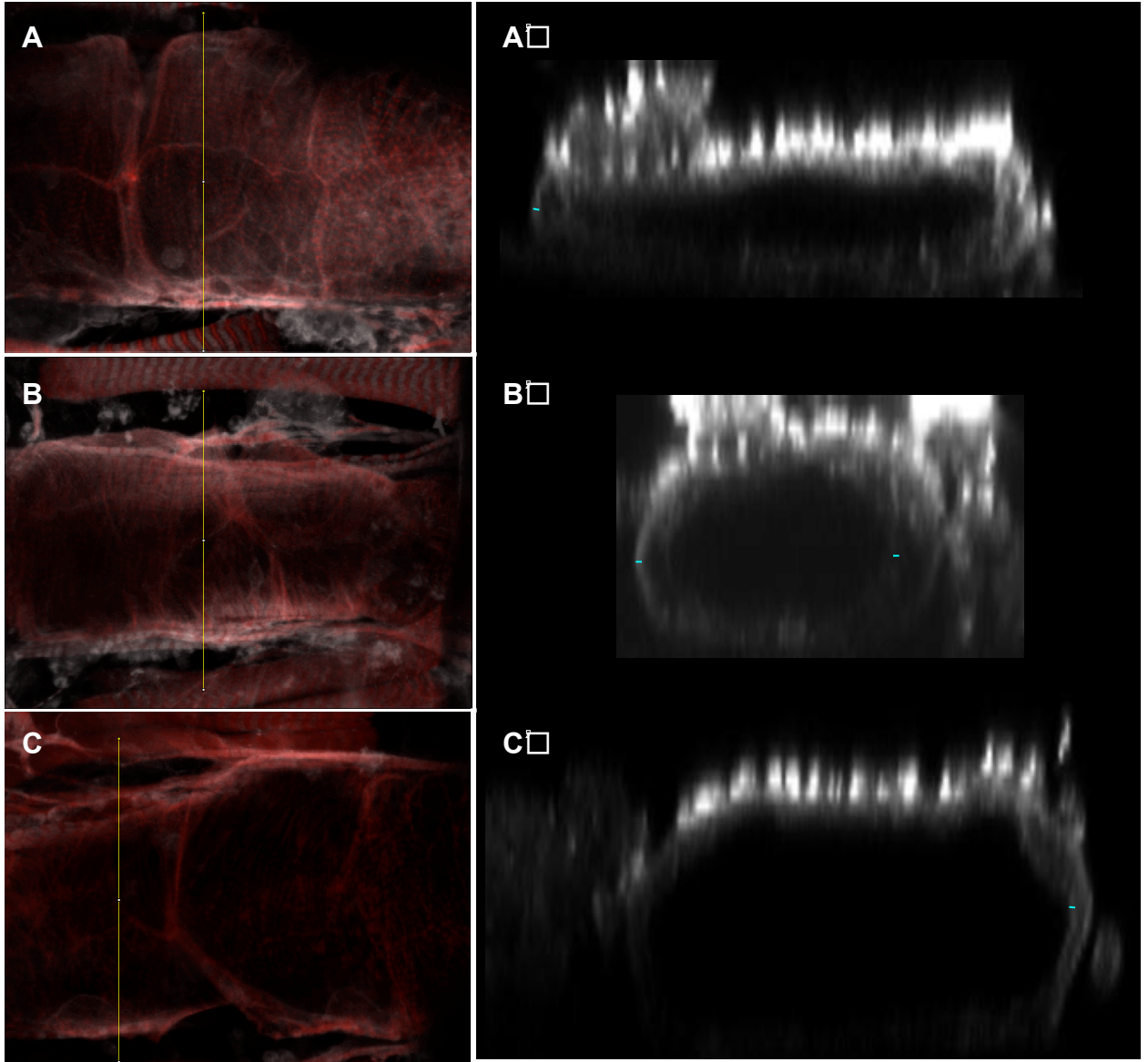


Figure 57. Amincissement de la paroi du cœur de la lignée *Hand>mbIRNAi*

A-C Immunomarquage avec Dg (gris) et phalloïdine (rouge) de cœurs de 1 semaine des lignées *Hand-gal4/+* (A), *UAS-mbIRNAi/+* (B) et *Hand>mbIRNAi* (C). Dg permet de délimiter les bords de la paroi. Pour chaque génotype, le trait jaune indique la position de la section transverse (A'-C'). Les traits bleus indiquent l'épaisseur de la paroi cardiaque. D) Représentation graphique des épaisseurs de la paroi cardiaque obtenues pour chaque génotype. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

2. Discussion et perspectives

En résumé, les analyses physiologiques indiquent que la lignée *Hand>mbIRNAi* développe une CMD associée à une augmentation de la période cardiaque. De leur côté, les lignées *Hand>bru-3*, *DM1₆₀₀* et *DM1₉₆₀* développent de la fibrillation qui semble évoluer dans le temps et avec la taille des répétitions vers un phénotype de battement de cœur en trois temps.

2.1. Mbl et Bru-3 à l'origine de symptômes cardiaques différents

Dans le muscle somatique larvaire, l'atténuation de *mbl* reproduit les phénotypes musculaires des lignées DM1 alors que le gain de fonction *bru-3* ne reproduit que certains aspects de la maladie. Nous avons donc été surpris de voir que dans le cœur, la lignée DM1 ne présente aucun aspect de la lignée *Hand>mbIRNAi* et seulement quelques caractéristiques rythmiques de la lignée *Hand>bru-3* avec une intensité différente. Par ailleurs, l'atténuation de *mbl* et le gain de fonction de *bru-3* développent uniquement comme phénotype similaire la dilatation du DD associée au relâchement du réseau de myofibrilles.

Ainsi, pour apporter de la clarté à ces divergences, il va être nécessaire de :

- Regarder par hybridation *in situ* et immunomarquage l'expression des répétitions CTG dans les cardioblastes. L'accumulation en *foci* des répétitions non codantes et la séquestration de Mbl n'ont jamais été montrées dans ce tissu chez la Drosophile. Etant donné la divergence des phénotypes on peut imaginer que soit Mbl n'est pas séquestré dans les *foci* si il est en compétition avec un facteur cardiaque pouvant lier les répétitions avec une plus grande affinité, soit l'expression de Mbl est suffisamment importante dans les cardioblastes pour que la protéine soit encore disponible pour agir bien qu'en partie séquestrée par les répétitions.
- Compléter les analyses physiologiques par une étude des mouches âgées de 7 semaines.
- Refaire l'analyse physiologique en utilisant le pilote cardiaque *Tin-Gal4* pour les croisements afin de vérifier la reproductibilité des phénotypes.

2.2. La cardiomyopathie dilatée chez les patients DM1

Les analyses physiologiques montrent que l'atténuation de *mbl* dans le cœur est à l'origine d'une CMD chez la Drosophile. Les résultats préliminaires de la quantification de l'épaisseur de la paroi du cœur des mouches *Hand>mbIRNAi* vont dans le même sens puisqu'ils montrent un amincissement de la paroi du cœur par rapport aux individus contrôles (Figure 57). Dans la littérature, il n'y a pas d'étude sur les phénotypes cardiaques des souris

invalidées pour les gènes *Mbnls*. En revanche, l'utilisation de morpholinos contre *mbn12* chez le poisson zèbre cause une dilatation de la cavité cardiaque (Machuca-Tzili *et al.*, 2011). Dans la mesure où aucune étude fonctionnelle n'a été faite en parallèle, on ne peut pas conclure s'il s'agit d'une CMD.

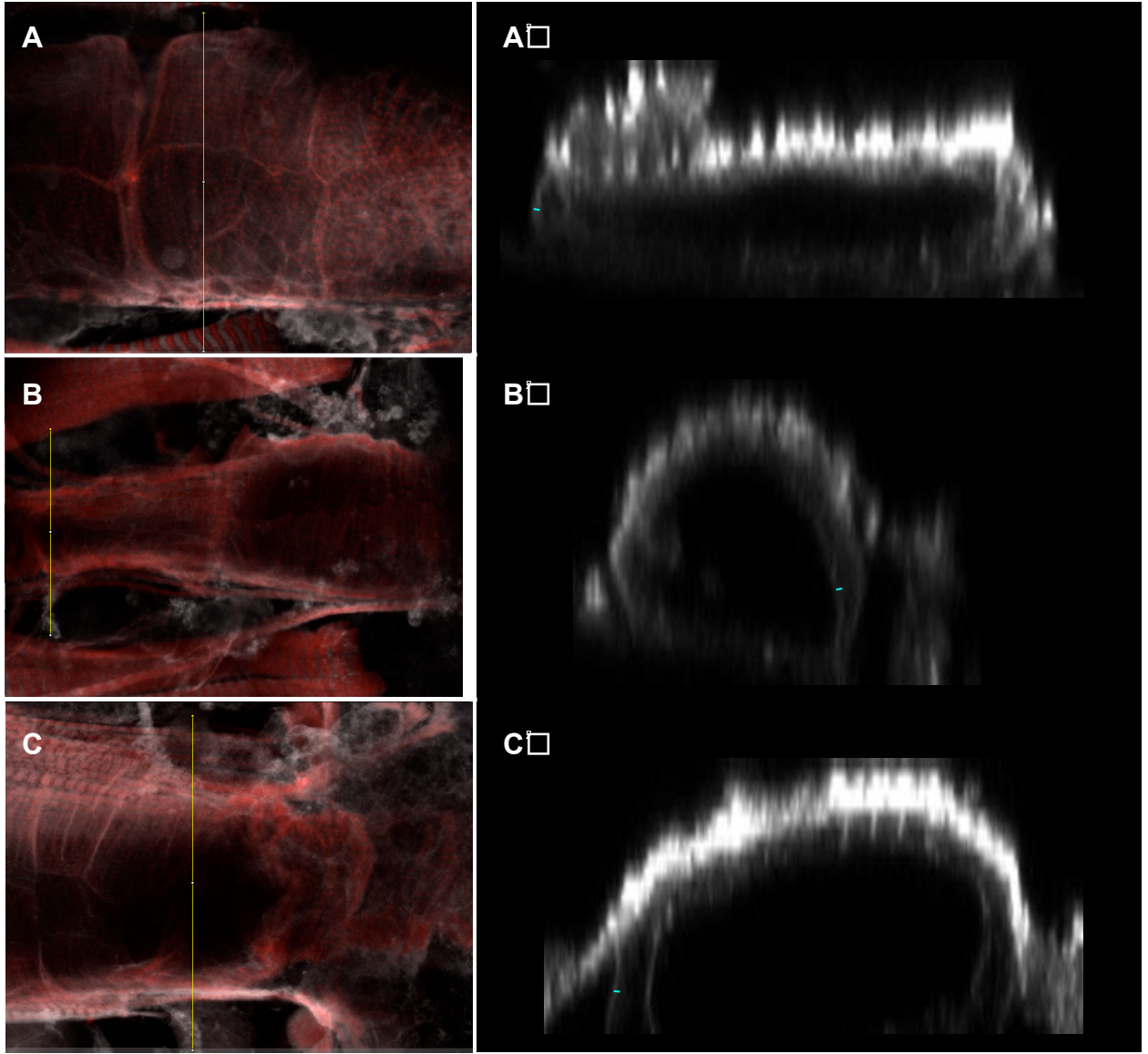
La lignée *Hand>bru-3* présente aussi un DD augmenté mais pas de diminution de la FR comme dans la lignée *Hand>mb1RNAi*. Ce phénotype peut donc faire penser à une cardiomyopathie hypertrophique (CMH). Cependant, les souris avec une induction de CUGBP1 dans le cœur présentent dans les huit jours qui suivent l'induction une CMD (Koshelev *et al.*, 2009). Aussi afin de savoir si les mouches développent plutôt une CMD ou une CMH il faudrait (i) mesurer les paramètres contractiles de ces individus à 7 semaines pour voir si la FR finit par diminuer ou si elle est maintenue et (ii) mesurer l'épaisseur de la paroi du tube cardiaque sur des coupes transversales de cœurs marqués avec un anticorps anti-Dg. Cette dernière mesure permettrait peut être de voir un amincissement de la paroi comme dans le cas d'une CMD ou au contraire un épaissement comme c'est le cas dans les CMH.

Chez les patients DM1, l'hypertrophie du VG n'est pas rare. En revanche, la CMD est mentionnée dans quelques cas de DM2 (von zur Muhlen *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2012) mais très peu rencontrée pour décrire les symptômes des patients DM1 (Schara and Schoer, 2006). En réalité, une seule étude montre un cas familial de CMD associé à la DM1 (Gunkel *et al.*, 2000). Les critères pour diagnostiquer une CMD sont une dilatation du VG et une dysfonction systolique. Ces critères sont retrouvés séparément dans les analyses de cohortes de patients DM1 qui mettent l'accent sur la structure cardiaque (Table 10) (Bhakta *et al.*, 2004; Hermans *et al.*, 2012; Dhand *et al.*, 2013). La question reste à savoir si ces symptômes sont tous deux présents au sein des mêmes patients. Tel n'est pas le cas dans les observations de Dhand *et al.*, mais le doute subsiste pour les deux autres études. Il semblerait que dans la DM1, la CMD apparaît bien souvent tardivement, et est observée chez les patients qui survivent à une bradycardie ou une tachyarythmie ou lors d'autopsies suite à une mort subite.

Ainsi, deux hypothèses s'offrent à moi pour comprendre le rôle de Mbl dans le cœur et l'incidence nulle de la CMD dans la population de mouches DM1 de moins de 5 semaines : (i) Le rôle de MBNL/Mbl dans le cœur n'est peut-être pas central dans la DM1, en tout cas chez la Drosophile ou (ii) les symptômes cardiaques évolutifs des mouches DM1 (fibrillation puis insuffisance cardiaque) évoluent peut être au delà de 5 semaines vers une CMD comme chez l'homme.

2.3. Fibrillation et insuffisance cardiaque

Les lignées *Hand>bru-3* et *Hand>960CTG* présentent de la fibrillation qui semble évoluer dans le temps vers un battement de cœur en trois temps. Bien que cela n'ait jamais



D Epaisseur paroi du coeur (μm)

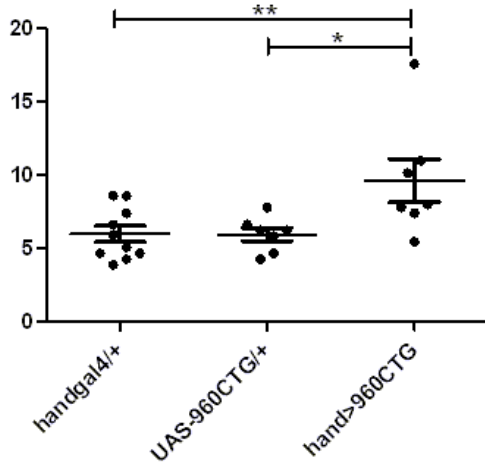


Figure 58. Epaissement de la paroi du cœur de la lignée *Hand>960CTG*

A-C] Immunomarquage avec Dg (gris) et phalloïdine (rouge) de cœurs de 1 semaine des lignées *Hand-gal4/+* (A), *UAS-960CTG/+* (B) et *Hand>960CTG* (C). Dg permet de délimiter les bords de la paroi. Pour chaque génotype, le trait jaune indique la position de la section transverse (A'-C'). Les traits bleus indiquent l'épaisseur de la paroi cardiaque. D) Représentation graphique des épaisseurs de la paroi cardiaque obtenues pour chaque génotype. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

été encore montré sur la mouche, le battement de cœur en trois temps fait penser à de l'insuffisance cardiaque (communications personnelles avec Pr. Lusson et Pr. Bodmer). Selon cette hypothèse, la dilatation télédiastolique précédant la systole serait une compensation du cœur pour maintenir un débit cardiaque normal.

Ce qui est intéressant avec ces observations, c'est que la fibrillation et l'insuffisance cardiaque sont des troubles fréquents dans la DM1 (Table 10). Dans notre modèle, la fibrillation qui se produit au cours de la systole (Figure 56D et observations personnelles) semble cohabiter puis laisser place dans le temps à ce qui s'apparenterait à une insuffisance cardiaque. Dans le cas présent, on peut émettre l'hypothèse que cette insuffisance cardiaque n'est pas due à une dysfonction systolique car il n'y a pas de diminution de la FR mais à une dysfonction diastolique. Afin de vérifier cette hypothèse on pourrait vérifier si les mouches ont l'épaisseur de la paroi du tube cardiaque augmentée. Les résultats préliminaires de la mesure de l'épaisseur de la paroi du cœur des mouches *Hand>960CTG* de 1 semaine montrent un épaississement significatif de la paroi par rapport aux mouches contrôles (Figure 58).

Dans la mesure où le gain de fonction *bru-3* et la lignée DM1₉₆₀ semblent partager ces phénotypes cardiaques évolutifs, il était normal de regarder si Bru-3 est mis en jeu. Le nombre de mouches présentant ces phénotypes étant atténué dans la lignée *DM1₉₆₀,df(bru-3)*, il semblerait effectivement que Bru-3 tienne un rôle dans l'insuffisance cardiaque. La stabilisation de CUGBP1 dans la DM1 passe par une hyperactivation de la PKC (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007). Pour savoir si la PKC pourrait être impliquée dans la fibrillation ou l'insuffisance cardiaque, nous avons regardé la distribution des phénotypes rythmiques de la lignée *Hand>PKC* qui induit l'expression de la forme hyperphosphorylée de PKC α dans le cœur. Le profil de la distribution des phénotypes de la lignée *Hand>PKC* s'apparente à celui de la lignée *Hand>bru-3* (Figure 59) suggérant la conservation de la voie de régulation de Bru-3/CUGBP1 par la PKC chez la Drosophile. Bien entendu, une telle régulation reste toujours à démontrer dans ce modèle.

Tout comme dans notre modèle, les modèles murins de surexpression de *CUGBP1* et EpA960 présentent des phénotypes cardiaques similaires qui peuvent être améliorés par inhibition de la PKC (Wang *et al.*, 2007; Koshelev *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Les souris EpA960 qui expriment dans le cœur le même transgène que les mouches *Hand>960CTG* exhibent une CMD, de l'arythmie et une dysfonction diastolique et systolique. Malgré la dysfonction diastolique que Drosophiles et souris DM1 paraissent avoir en commun, les autres symptômes divergent. Les raisons de ces divergences sont difficilement explicables. L'explication la plus simple et la plus évidente est la différence morphologique et fonctionnelle du cœur vertébré par rapport au tube cardiaque.

Distribution des phénotypes rythmiques

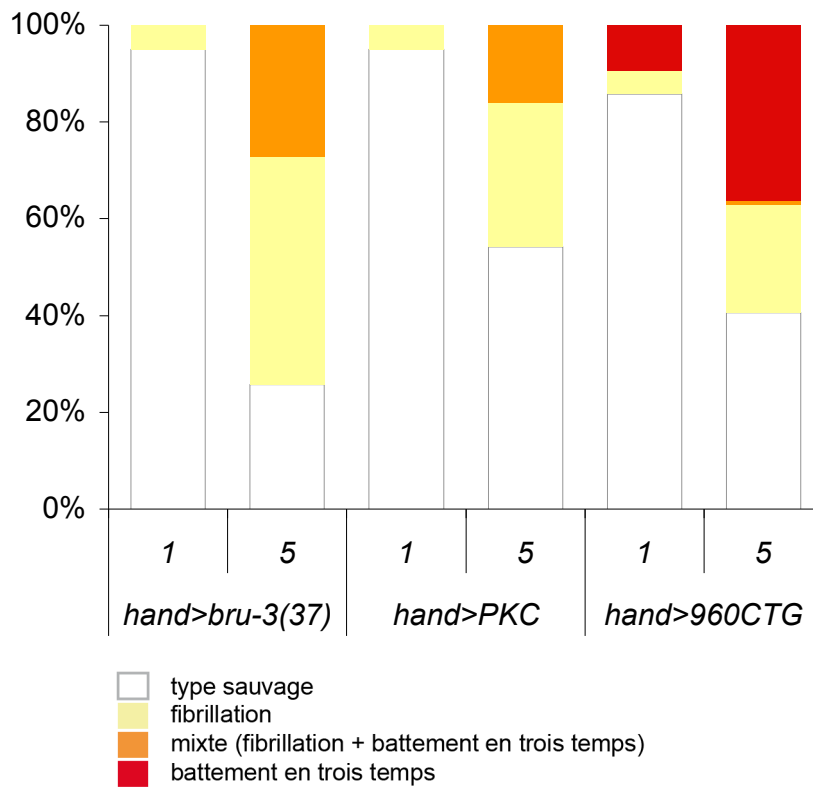


Figure 59. Distribution des phénotypes rythmiques de la lignée *Hand>PKC*

Le profil de la distribution des phénotypes rythmiques de la lignée *Hand>PKC* s'apparente à celui de la lignée gain de fonction *bru-3* (*Hand>bru-3*).

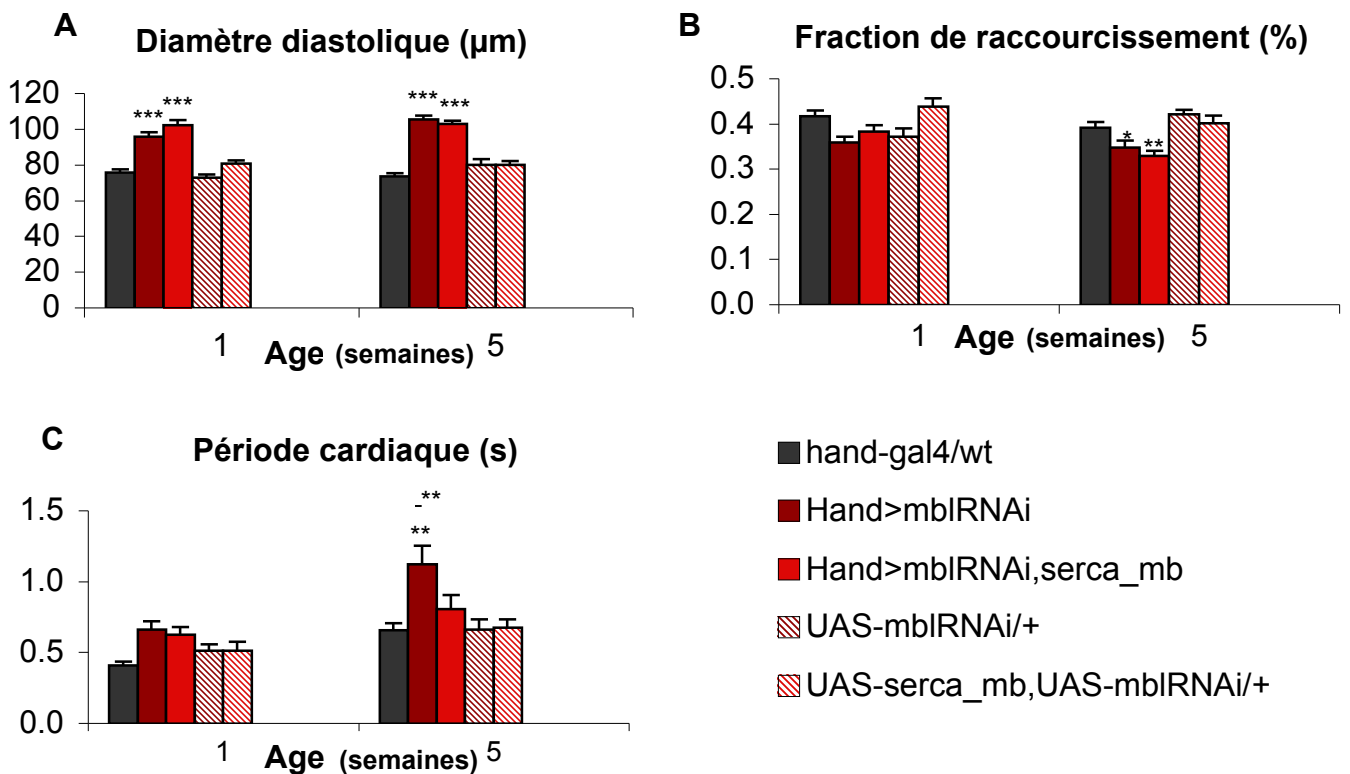


Figure 60. dSERCA sauve les phénotypes rythmiques mais pas contractiles de la lignée *Hand>mbIRNAi*

A) Diamètre diastolique de la lignée *Hand>mbIRNAi,dSERCA_mb* est significativement augmenté par rapport aux contrôles et équivalent à celui de la lignée *Hand>mbIRNAi*. B) La fraction de raccourcissement témoin de la capacité du cœur à pomper est diminuée significativement à 5 semaines en contexte *Hand>mbIRNAi,dSERCA_mb*. C) La période cardiaque de la lignée *Hand>mbIRNAi,dSERCA_mb* est rétablie par rapport aux lignées contrôles. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. *Hand-gal4/+* et *UAS-mbIRNAi,dSERCA_mb/+* ou *UAS-mbIRNAi/+*.

2.4. Implication de dSERCA dans les symptômes cardiaques

Dans le chapitre précédent j'ai émis l'hypothèse que les phénotypes de battement cardiaque en trois temps était une manifestation d'une dysfonction diastolique. Cependant, étant données les dérégulations des pompes et canaux ioniques dans la DM1, il se pourrait également que la dilatation télédiastolique soit l'expression d'un simple retard de relaxation du muscle cardiaque. Nous avons vu dans l'analyse du muscle somatique que *dSERCA* est mal épissé dans les lignées DM1 et atténuée pour Mbl. *dSERCA* est également exprimé dans le cœur de la Drosophile. Il a été montré que *dSERCA* intervenait dans l'excitabilité du cœur et favorisait la répétition des contractions (Sanyal *et al.*, 2006). D'ailleurs, les mutants pour *dSERCA* présentent des coeurs qui battent plus lentement.

Il serait donc intéressant de savoir si dans les lignées modèles de DM1, *dSERCA* est impliqué dans les phénotypes rythmiques cardiaques. Pour cela, il faudrait dans un premier temps vérifier si le transcrit est également mal épissé dans les coeurs adultes des lignées pathologiques. Malgré ce point en suspens pour le moment, nous avons commencé à tester l'implication de *dSERCA* dans le cœur en analysant la fonction cardiaque des lignées pathologiques dans lesquelles nous surexprimons le transcrit avec le domaine C-terminal transmembranaire. Les données préliminaires à notre disposition ne permettent pas de conclure quant au rôle de *dSERCA* dans la fibrillation pour les lignées *Hand>bru-3*, *Hand>600CTG* et *Hand>960CTG* car il nous faut augmenter le nombre d'individus à 5 semaines. En revanche pour la lignée *Hand>mbIRNAi*, l'apport de l'isoforme transmembranaire de *dSERCA* ne corrige pas la CMD mais rétablit la période cardiaque (Figure 60). Ces données confirment le rôle de *dSERCA* dans le rythme cardiaque et vont dans le sens des résultats de Sanyal et collègues.

2.5. Conclusion

L'analyse physiologique des mouches âgées de 1 et 5 semaines offre des données qui méritent notre attention mais soulève beaucoup d'interrogations. Afin d'avoir une meilleure vue d'ensemble sur la complexité des phénotypes cardiaques de nos différentes lignées pathologiques, il va être nécessaire à l'avenir d'étendre l'analyse physiologique aux mouches âgées de 7 semaines. Par ailleurs, il sera nécessaire de suivre l'évolution dans le temps de l'épaisseur de la paroi cardiaque afin de pouvoir trancher sur la nature des phénotypes physiologiques lorsque c'est nécessaire.

3. Matériel et méthodes

3.1. Tests de survie

Pour chaque génotype, 100 mouches ont été réparties équitablement dans 10 tubes. Le nombre de mouches mortes a été quotidiennement comptabilisé.

3.2. Analyse structurale des coeurs

L'analyse de la structure du cœur a été réalisée à l'aide d'une lignée provenant de F. Snorrer qui exprime la myosine fusionnée à la GFP et le pilote *Mef-Gal4* (*Mef-Gal4* ; *MHC-GFP*). Les mesures ont été faites au niveau des fibres circulaires des ostioles dans les segments A2-A3. Pour chaque image, la somme des aires dépourvues de myofibrilles a été rapportée à l'aire de la surface totale. 6-8 coeurs par génotype ont été analysés.

3.3. Analyse physiologique

Les analyses physiologiques ont été réalisées sur des mouches femelles de 4-5 jours (1 semaine) ou de 5 semaines. Les protocoles de dissection et d'analyse des films ont été mis au point par Karen Ocorr.

3.3.1. Préparation de *Drosophile* semi-intacte

Les mouches sont anesthésiées avec du FlyNap (Carolina, Burlington, USA) pendant 2-5 min puis disséquées après fixation sur le dos dans une boîte de Petri tapissée de Vaseline. La tête, le thorax ventral, la cuticule abdominale ventrale sont enlevés afin d'exposer le contenu abdominal. Les cellules adipocytaires, et tous les organes internes excepté le cœur sont éliminés. La dissection est réalisée dans de l'hémolymphe artificielle oxygénée (108 mM Na⁺, 5 mM K⁺, 2 mM Ca²⁺, 8 mM MgCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 4 mM NaHCO₃, 10 mM sucrose, 5 mM trehalose, and 5 mM Hepes (pH 7.1)). Ces préparations semi-intactes sont incubées 15-20 min sous oxygénation avant d'être filmées.

3.3.2. Analyse des films

L'analyse des contractions cardiaques a été effectuée à partir de films dits « high frame rate » de préparations semi-intactes. Les films de 30 sec ont été réalisés à une vitesse de 100-150 images par secondes grâce à une caméra digitale (Digital camera C9300, Hamamatsu, McBain Instruments, Chatsworth, CA) sur un microscope Zeiss (Axiophot, Zeiss, Allemagne) avec un objectif 10X à immersion. Le logiciel Simple PCI imaging a été utilisé pour acquérir les films et corriger le contraste des images.

Le programme SOHA (Semi-automated optical heartbeat Analysis) basé sur le logiciel Matlab (Ocorr *et al.*, 2009) a été utilisé pour le traitement des films. Le logiciel a permis de déterminer manuellement les DD et DS ainsi que la FR grâce à la formule :

$$FR = [(DD-DS)/DD] \times 100$$

La fibrillation est déterminée dans le programme SOHA si IS>0.5s ou si ID<0.06s. Néanmoins, certaines fibrillations visibles à l'œil et non détectées par le logiciel (Figure 56D) ont été rajoutées manuellement après relecture des films. Le programme ne permet pas de faire la distinction entre fibrillation et flutter. Le nombre de mouches présentant un phénotype de battement en 3 temps a été déterminé manuellement d'après les M-modes réalisés sur l'ensemble de la durée du film.

3.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel Graph Pad Prism (GraphPad, Inc, USA, version 5.02). La normalité des échantillons est évaluée avec le test de Kolmogorov-Smirnov. Une analyse de la variance suivie d'un test de Newman-Keuls ou d'un test de Dunn sont appliqués selon que l'échantillon suit une distribution normale ou non. Chaque lignée pathologique est comparée aux lignées contrôle du pilote (*Hand-gal4/+*) et contrôle du transgène (*UAS-trangène/+*). La plus petite significativité des deux est reportée sur le graphe. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur standard, avec $P < 0.05$ considéré comme statistiquement différent.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

« Une conclusion, c'est quand vous en avez assez de penser. »

Herbert Albert Fisher

A propos du modèle

Le modèle de Drosophile de la DM1 généré au cours de ma thèse est avantageux par rapport aux modèles invertébrés existants puisqu'il permet de voir un effet de la taille des répétitions. Dans la mesure où cela reste un modèle, il présente des inconvénients et des lacunes. Comme je l'ai déjà mentionné l'inconvénient de ce modèle est le rôle que pourraient jouer les interruptions de répétitions CTG sur les phénotypes. Comme suggéré, l'effet des interruptions pourrait être évalué à l'aide d'un transgène inséré de manière site-spécifique dans la lignée *M{vas-int.Dm}ZH-2A*, *M{3xP3-RFP.attP}ZH-86Fb* (BL#24749, Bloomington) et dont la séquence non codante aléatoire serait interrompue toutes les 20 paires de bases par CTCGA. Concernant les lacunes de ce modèle, elles sont toutes deux liées à sa qualité principale. En voulant étudier la toxicité de l'expansion, les répétitions ont été sorties de leur contexte (gène et locus *DMPK*) chez la Drosophile. De ce fait, nous ne pouvons voir l'effet de l'haploinsuffisance de *DMPK* sur les phénotypes et ne pouvons analyser le rôle de cette kinase dont la fonction est encore peu connue. Néanmoins, je ne pense pas que cela ait été possible ou pertinent chez la Drosophile d'étudier l'effet de l'haploinsuffisance de l'orthologue de *DMPK*. En effet, lorsque j'ai débuté ma thèse en 2009, la base de donnée Compare (<http://compare.ibdml.univ-mrs.fr/>) recensait le gène *genghis khan* (*gek*) comme orthologue chez la Drosophile de *DMPK*. Or ce gène ne possède dans sa région 3' non traduite qu'un triplet CTG suggérant que soit *gek* n'est pas l'orthologue de *DMPK* soit ces répétitions non codantes n'ont pas d'importance fonctionnelle pour le transcrit et n'ont pas été conservées. Aujourd'hui en 2013, Compare a retiré tout orthologue invertébré de *DMPK* de sa base de donnée appuyant notre première hypothèse. On peut donc s'interroger sur l'importance de cette kinase dans la cellule si elle n'est pas conservée entre les espèces. Pour finir, notre modèle ne se prête pas non plus à l'analyse de l'effet d'une transcription bidirectionnelle des répétitions. Cependant, un autre modèle de Drosophile s'intéressant à cet aspect de la pathogenèse (Yu *et al.*, 2011) a été récemment généré.

Fonction de Bru-3 dans le muscle sain

En m'intéressant à l'orthologue de CUGBP1 dans le cadre de la DM1, mes recherches m'ont menée à étudier un gène très peu étudié chez la Drosophile, *bru-3*. Effectivement, l'anticorps généré dirigé contre Bru-3 et l'analyse des puces du gain de fonction *bru-3* m'ont conduite à établir les prémices d'un modèle concernant les rôles possibles de Bru-3 au sein du modèle hypothétique de « traduction/ assemblage protéique co-translationnel » dans les muscles. Par la suite, il me semble nécessaire de caractériser les formes nucléaires et cytoplasmiques de Bru-3 par Western Blot et séquençage. Par ailleurs, le niveau de Bru-3 nucléaire et cytoplasmique doit aussi être quantifié par Western Blot dans chaque condition pathologique.

Analyse transcriptomique du muscle somatique : les pistes à suivre

L'analyse transcriptomique a permis d'identifier un rôle pour *Mp20* et *dSERCA* dans les phénotypes des larves DM1. Par ailleurs, ont été identifiés bon nombre de gènes intervenant dans le métabolisme glycolytique et la phosphorylation oxydative. Le bon fonctionnement musculaire dépendant de ces voies, il serait intéressant de creuser ces aspects très peu étudiés dans les autres modèles et chez les patients. De même on devrait peut être davantage regarder comment l'altération de l'expression des gènes impliqués dans les processus d'oxido-réduction impacte le muscle.

La recherche de biomarqueurs de la sévérité de la maladie est en plein essor. Nous avons observé dans l'équipe que l'expression de gènes en lien avec l'inositol pouvait servir de biomarqueur dans le muscle larvaire. L'expression de ces gènes est sur le point d'être testée sur les cellules de patients. Il serait peut être intéressant de déterminer comment cette voie pourrait être liée au fonctionnement du muscle squelettique normal et pathologique dans le cadre de la DM1.

Analyse du muscle cardiaque

Afin d'affiner nos observations sur le cœur des mouches adultes pour pouvoir poser un « diagnostic » plus précis, l'analyse physiologique doit être étendue aux mouches âgées de 7 semaines et une analyse structurale du cœur centrée sur l'épaisseur de la paroi doit être réalisée pour chaque âge étudié.

L'objectif final de l'étude du cœur est d'extraire les transcrits (codants et non codants) spécifiquement des cardioblastes grâce à la méthode du TU-tagging actuellement mise au point dans l'équipe pour faire du séquençage en masse. On espère ainsi révéler de nouveaux gènes dérégulés dans la DM1 et pouvoir faire des expériences de sauvetage afin d'identifier des marqueurs spécifiques de symptômes cardiaques précis de la DM1 et de leur évolution.

Ainsi les travaux initiés au cours de ma thèse confirment la toxicité du gain de fonction des répétitions non codantes dans ce nouveau modèle invertébré de la DM1 et l'implication de *Mbl* et *Bru-3* dans la pathogenèse. Les données issues des analyses phénotypiques des muscles somatiques et cardiaques sont encourageantes et les études devraient être approfondies dans un futur proche tant d'un point de vue phénotypique que transcriptomique. À long terme, les analyses pourraient être étendues à d'autres tissus comme le système nerveux et transposées aux modèles vertébrés et patients DM1.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abmayr, S.M., and Pavlath, G.K. (2012). Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* 139, 641-656.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- Alwazzan, M., Newman, E., Hamshere, M.G., and Brook, J.D. (1999). Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1491-1497.
- Amack, J.D., and Mahadevan, M.S. (2001). The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1879-1887.
- Amack, J.D., Reagan, S.R., and Mahadevan, M.S. (2002). Mutant DMPK 3'-UTR transcripts disrupt C2C12 myogenic differentiation by compromising MyoD. *J. Cell. Biol.* 159, 419-429.
- Anant, S., Henderson, J.O., Mukhopadhyay, D., Navaratnam, N., Kennedy, S., Min, J., and Davidson, N.O. (2001). Novel role for RNA-binding protein CUGBP2 in mammalian RNA editing. CUGBP2 modulates C to U editing of apolipoprotein B mRNA by interacting with apobec-1 and ACF, the apobec-1 complementation factor. *J. Biol. Chem.* 276, 47338-47351.
- Andree, B., Duprez, D., Vorbusch, B., Arnold, H.H., and Brand, T. (1998). BMP-2 induces ectopic expression of cardiac lineage markers and interferes with somite formation in chicken embryos. *Mech Dev* 70, 119-131.
- Araujo, K.P., Bonuccelli, G., Duarte, C.N., Gaiad, T.P., Moreira, D.F., Feder, D., Belizario, J.E., Miglino, M.A., Lisanti, M.P., and Ambrosio, C.E. (2013). Bortezomib (PS-341) treatment decreases inflammation and partially rescues the expression of the dystrophin-glycoprotein complex in GRMD dogs. *PLoS One* 8, e61367.
- Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., M, M., Perez-Alonso, M., and Baylies, M. (1998). The muscleblind gene participates in the organization of Z bands and epidermal attachments of drosophila muscles and is regulated by Dmef2. *Developmental biology* 195.
- Artero, R.D., Castanon, I., and Baylies, M.K. (2001). The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling. *Development* 128, 4251-4264.
- Azpiazu, N., and Frasch, M. (1993). tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes Dev* 7, 1325-1340.
- Azpiazu, N., Lawrence, P.A., Vincent, J.P., and Frasch, M. (1996). Segmentation and specification of the *Drosophila* mesoderm. *Genes Dev* 10, 3183-3194.
- Balogopalan, L., Keller, C.A., and Abmayr, S.M. (2001). Loss-of-function mutations reveal that the *Drosophila* nautilus gene is not essential for embryonic myogenesis or viability. *Dev Biol* 231, 374-382.
- Barral, J.M., Bauer, C.C., Ortiz, I., and Epstein, H.F. (1998). Unc-45 mutations in *Caenorhabditis elegans* implicate a CRO1/She4p-like domain in myosin assembly. *J Cell Biol* 143, 1215-1225.
- Barron, M., Gao, M., and Lough, J. (2000). Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative. *Dev Dyn* 218, 383-393.
- Bataille, L., Delon, I., Da Ponte, J.P., Brown, N.H., and Jagla, K. (2010). Downstream of identity genes: muscle-type-specific regulation of the fusion process. *Dev Cell* 19, 317-328.

- Bataille, L., Delon, I., Da Ponte, J.P., Brown, N.H., and Jagla, K. (2010). Downstream of identity genes: muscle-type-specific regulation of the fusion process. *Dev. Cell.* **19**, 317-328.
- Bate, M. (1990). The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* **110**, 791-804.
- Bate, M., and Rushton, E. (1993). Myogenesis and muscle patterning in *Drosophila*. *C R Acad Sci III* **316**, 1047-1061.
- Beckett, K., and Baylies, M.K. (2006). The development of the *Drosophila* larval body wall muscles. *Int Rev Neurobiol* **75**, 55-70.
- Beckett, K., and Baylies, M.K. (2007). 3D analysis of founder cell and fusion competent myoblast arrangements outlines a new model of myoblast fusion. *Dev Biol* **309**, 113-125.
- Beffy, P., Del Carratore, R., Masini, M., Furling, D., Puymirat, J., Masiello, P., and Simili, M. (2010). Altered signal transduction pathways and induction of autophagy in human myotonic dystrophy type 1 myoblasts. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 1973-1983.
- Begemann, G., Paricio, N., Artero, R., Kiss, I., Perez-Alonso, M., and Mlodzik, M. (1997). *muscleblind*, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development* **124**, 4321-4331.
- Berger, S., Schafer, G., Kesper, D.A., Holz, A., Eriksson, T., Palmer, R.H., Beck, L., Klambt, C., Renkawitz-Pohl, R., and Onel, S.F. (2008). WASP and SCAR have distinct roles in activating the Arp2/3 complex during myoblast fusion. *J Cell Sci* **121**, 1303-1313.
- Berul, C.I., Maguire, C.T., Aronovitz, M.J., Greenwood, J., Miller, C., Gehrman, J., Housman, D., Mendelsohn, M.E., and Reddy, S. (1999). DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *J. Clin. Invest.* **103**, R1-7.
- Bhakta, D., Lowe, M.R., and Groh, W.J. (2004). Prevalence of structural cardiac abnormalities in patients with myotonic dystrophy type I. *Am Heart J* **147**, 224-227.
- Bigot, A., Klein, A.F., Gasnier, E., Jacquemin, V., Ravassard, P., Butler-Browne, G., Mouly, V., and Furling, D. (2009). Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells. *Am J Pathol* **174**, 1435-1442.
- Biressi, S., Tagliafico, E., Lamorte, G., Monteverde, S., Tenedini, E., Roncaglia, E., Ferrari, S., Cusella-De Angelis, M.G., Tajbakhsh, S., and Cossu, G. (2007). Intrinsic phenotypic diversity of embryonic and fetal myoblasts is revealed by genome-wide gene expression analysis on purified cells. *Dev Biol* **304**, 633-651.
- Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., and Birchmeier, C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* **376**, 768-771.
- Bober, E., Franz, T., Arnold, H.H., Gruss, P., and Tremblay, P. (1994). Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development* **120**, 603-612.
- Bodmer, R. (1995). Heart development in *Drosophila* and its relationship to vertebrates. *Trends Cardiovasc Med* **5**, 21-28.
- Bonn, B.R., Rudolf, A., Hornbruch-Freitag, C., Daum, G., Kuckwa, J., Kastl, L., Buttgereit, D., and Renkawitz-Pohl, R. (2012). Myosin heavy chain-like localizes at cell contact sites during *Drosophila* myoblast fusion and interacts in vitro with Rolling pebbles 7. *Exp Cell Res* **319**, 402-416.
- Boucher, C.A., King, S.K., Carey, N., Krahe, R., Winchester, C.L., Rahman, S., Creavin, T., Meghji, P., Bailey, M.E., Chartier, F.L., et al. (1995). A novel homeodomain-encoding gene is

associated with a large CpG island interrupted by the myotonic dystrophy unstable (CTG)_n repeat. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 1919-1925.

Bour, B.A., Chakravarti, M., West, J.M., and Abmayr, S.M. (2000). *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev* **14**, 1498-1511.

Bourgouin, C., Lundgren, S.E., and Thomas, J.B. (1992). *Apterous* is a *Drosophila* LIM domain gene required for the development of a subset of embryonic muscles. *Neuron* **9**, 549-561.

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.

Brais, B. (2003). Oculopharyngeal muscular dystrophy: a late-onset polyalanine disease. *Cytogenet Genome Res* **100**, 252-260.

Brais, B., Bouchard, J.P., Xie, Y.G., Rochefort, D.L., Chretien, N., Tome, F.M., Lafreniere, R.G., Rommens, J.M., Uyama, E., Nohira, O., et al. (1998). Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet* **18**, 164-167.

Brent, A.E., and Tabin, C.J. (2002). Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 548-557.

Brohl, D., Vasyutina, E., Czajkowski, M.T., Griger, J., Rassek, C., Rahn, H.P., Purfurst, B., Wende, H., and Birchmeier, C. (2012). Colonization of the satellite cell niche by skeletal muscle progenitor cells depends on Notch signals. *Dev. Cell.* **23**, 469-481.

Brohmann, H., Jagla, K., and Birchmeier, C. (2000). The role of *Lbx1* in migration of muscle precursor cells. *Development* **127**, 437-445.

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.

Brouwer, J.R., Willemsen, R., and Oostra, B.A. (2009). Microsatellite repeat instability and neurological disease. *Bioessays* **31**, 71-83.

Brunner, H.G., Bruggenwirth, H.T., Nillesen, W., Jansen, G., Hamel, B.C., Hoppe, R.L., de Die, C.E., Howeler, C.J., van Oost, B.A., Wieringa, B., 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**, 1016-1023.

Buff, E., Carmena, A., Gisselbrecht, S., Jimenez, F., and Michelson, A.M. (1998). Signalling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor is required for the specification and diversification of embryonic muscle progenitors. *Development* **125**, 2075-2086.

Carmena, A., Bate, M., and Jimenez, F. (1995). *Lethal of scute*, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* **9**, 2373-2383.

Carmena, A., Buff, E., Halfon, M.S., Gisselbrecht, S., Jimenez, F., Baylies, M.K., and Michelson, A.M. (2002). Reciprocal regulatory interactions between the Notch and Ras signaling pathways in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Dev Biol* **244**, 226-242.

Carmena, A., Gisselbrecht, S., Harrison, J., Jimenez, F., and Michelson, A.M. (1998a). Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Genes Dev* **12**, 3910-3922.

- Carmena, A., Murugasu-Oei, B., Menon, D., Jimenez, F., and Chia, W. (1998b). Inscuteable and numb mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev* 12, 304-315.
- Castanon, I., Von Stetina, S., Kass, J., and Baylies, M.K. (2001). Dimerization partners determine the activity of the Twist bHLH protein during *Drosophila* mesoderm development. *Development* 128, 3145-3159.
- Charizanis, K., Lee, K.Y., Batra, R., Goodwin, M., Zhang, C., Yuan, Y., Shiue, L., Cline, M., Scotti, M.M., Xia, G., et al. (2012). Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron* 75, 437-450.
- Charlet, B.N., Savkur, R.S., Singh, G., Philips, A.V., Grice, E.A., and Cooper, T.A. (2002). Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol. Cell.* 10, 45-53.
- Chartier, A., Benoit, B., and Simonelig, M. (2006). A *Drosophila* model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *EMBO J* 25, 2253-2262.
- Chartier, A., Raz, V., Sterrenburg, E., Verrips, C.T., van der Maarel, S.M., and Simonelig, M. (2009). Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy by muscular expression of Llama single-chain intrabodies in vivo. *Hum Mol Genet* 18, 1849-1859.
- Chartier, A., Zaffran, S., Astier, M., Semeriva, M., and Gratecos, D. (2002). Pericardin, a *Drosophila* type IV collagen-like protein is involved in the morphogenesis and maintenance of the heart epithelium during dorsal ectoderm closure. *Development* 129, 3241-3253.
- Chen, E.H., and Olson, E.N. (2001). Antisocial, an intracellular adaptor protein, is required for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Cell* 1, 705-715.
- Chen, E.H., Pryce, B.A., Tzeng, J.A., Gonzalez, G.A., and Olson, E.N. (2003). Control of myoblast fusion by a guanine nucleotide exchange factor, loner, and its effector ARF6. *Cell* 114, 751-762.
- Chen, K.Y., Pan, H., Lin, M.J., Li, Y.Y., Wang, L.C., Wu, Y.C., and Hsiao, K.M. (2007). Length-dependent toxicity of untranslated CUG repeats on *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 352, 774-779.
- 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.
- Clark, I.B., Boyd, J., Hamilton, G., Finnegan, D.J., and Jarman, A.P. (2006). D-six4 plays a key role in patterning cell identities deriving from the *Drosophila* mesoderm. *Dev Biol* 294, 220-231.
- Cleary, J.D., Tome, S., Lopez Castel, A., Panigrahi, G.B., Foiry, L., Hagerman, K.A., Sroka, H., Chitayat, D., Gourdon, G., and Pearson, C.E. (2009). Tissue- and age-specific DNA replication patterns at the CTG/CAG-expanded human myotonic dystrophy type 1 locus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1079-1087.
- Cripps, R.M., and Olson, E.N. (2002). Control of cardiac development by an evolutionarily conserved transcriptional network. *Dev Biol* 246, 14-28.
- Crozatier, M., and Vincent, A. (1999). Requirement for the *Drosophila* COE transcription factor Collier in formation of an embryonic muscle: transcriptional response to notch signalling. *Development* 126, 1495-1504.
- Cudia, P., Bernasconi, P., Chiodelli, R., Mangiola, F., Bellocchi, F., Dello Russo, A., Angelini, C., Romeo, V., Melacini, P., Politano, L., et al. (2009). Risk of arrhythmia in type I myotonic dystrophy: the role of clinical and genetic variables. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80, 790-793.

- 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.
- Davis, B.M., McCurrach, M.E., Taneja, K.L., Singer, R.H., and Housman, D.E. (1997). Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7388-7393.
- de Die-Smulders, C.E., Howeler, C.J., Thijs, C., Mirandolle, J.F., Anten, H.B., Smeets, H.J., Chandler, K.E., and Geraedts, J.P. (1998). Age and causes of death in adult-onset myotonic dystrophy. *Brain* 121 (Pt 8), 1557-1563.
- de Haro, M., Al-Ramahi, I., De Gouyon, B., Ukani, L., Rosa, A., Faustino, N.A., Ashizawa, T., Cooper, T.A., and Botas, J. (2006). MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a Drosophila model of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2138-2145.
- de Haro, M., Al-Ramahi, I., Jones, K.R., Holth, J.K., Timchenko, L.T., and Botas, J. (2013). Smaug/SAMD4A restores translational activity of CUGBP1 and suppresses CUG-induced myopathy. *PLoS Genet.* 9, e1003445.
- De Temmerman, N., Sermon, K., Seneca, S., De Rycke, M., Hilven, P., Lissens, W., Van Steirteghem, A., and Liebaers, I. (2004). Intergenerational instability of the expanded CTG repeat in the DMPK gene: studies in human gametes and preimplantation embryos. *Am J Hum Genet* 75, 325-329.
- Delaunay, J., Le Mee, G., Ezzeddine, N., Labesse, G., Terzian, C., Capri, M., and Ait-Ahmed, O. (2004). The Drosophila Bruno paralogue Bru-3 specifically binds the EDEN translational repression element. *Nucleic Acids Res.* 32, 3070-3082.
- DeLaurier, A., Schweitzer, R., and Logan, M. (2006). Pitx1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb. *Dev Biol* 299, 22-34.
- den Hoed, M., Eijgelsheim, M., Esko, T., Brundel, B.J., Peal, D.S., Evans, D.M., Nolte, I.M., Segre, A.V., Holm, H., Handsaker, R.E., et al. (2013). Identification of heart rate-associated loci and their effects on cardiac conduction and rhythm disorders. *Nat Genet* 45, 621-631.
- Denis, J.A., Gauthier, M., Rachdi, L., Aubert, S., Giraud-Triboulet, K., Poydenot, P., Benchoua, A., Champon, B., Maury, Y., Baldeschi, C., et al. (2013). mTOR-dependent proliferation defect in human ES-derived neural stem cells affected by myotonic dystrophy type 1. *J. Cell. Sci.* 126, 1763-1772.
- Dhand, U.K., Raja, F., and Aggarwal, K. (2013). Structural myocardial involvement in adult patients with type 1 myotonic dystrophy. *Neurol Int* 5, e5.
- Di Costanzo, A., de Cristofaro, M., Di Iorio, G., Daniele, A., Bonavita, S., and Tedeschi, G. (2009). Paternally inherited case of congenital DM1: brain MRI and review of literature. *Brain Dev* 31, 79-82.
- Dietrich, S., Schubert, F.R., Healy, C., Sharpe, P.T., and Lumsden, A. (1998). Specification of the hypaxial musculature. *Development* 125, 2235-2249.
- Difranco, M., Yu, C., Quinonez, M., and Vergara, J.L. (2012). Age-Dependent Chloride Channel Expression in Skeletal Muscle Fibers of Normal and Hsarl Myotonic Mice. *J. Physiol.*
- Dlugosz, A.A., Antin, P.B., Nachmias, V.T., and Holtzer, H. (1984). The relationship between stress fiber-like structures and nascent myofibrils in cultured cardiac myocytes. *J Cell Biol* 99, 2268-2278.
- Du, H., Cline, M.S., Osborne, R.J., Tuttle, D.L., Clark, T.A., Donohue, J.P., Hall, M.P., Shiue, L., Swanson, M.S., Thornton, C.A., et al. (2010). Aberrant alternative splicing and

extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 187-193.

Duan, H., Skeath, J.B., and Nguyen, H.T. (2001). *Drosophila* *Lame duck*, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development. *Development* **128**, 4489-4500.

Duan, H., Zhang, C., Chen, J., Sink, H., Frei, E., and Noll, M. (2007). A key role of *Pox meso* in somatic myogenesis of *Drosophila*. *Development* **134**, 3985-3997.

Duan, R., and Gallagher, P.J. (2009). Dependence of myoblast fusion on a cortical actin wall and nonmuscle myosin IIA. *Dev Biol* **325**, 374-385.

Dubrulle, J., McGrew, M.J., and Pourquie, O. (2001). FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell* **106**, 219-232.

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

Echeverria, G.V., and Cooper, T.A. (2013). Muscleblind-like 1 activates insulin receptor exon 11 inclusion by enhancing U2AF65 binding and splicing of the upstream intron. *Nucleic Acids Res.*

Edwards, J.M., Long, J., de Moor, C.H., Emsley, J., and Searle, M.S. (2013). Structural insights into the targeting of mRNA GU-rich elements by the three RRM of CELF1. *Nucleic Acids Res.*

Eisenberg, I., Eran, A., Nishino, I., Moggio, M., Lamperti, C., Amato, A.A., Lidov, H.G., Kang, P.B., North, K.N., Mitrani-Rosenbaum, S., et al. (2007). Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 17016-17021.

Eisenberg, L.M., and Markwald, R.R. (1995). Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res* **77**, 1-6.

Epstein, J.A., Shapiro, D.N., Cheng, J., Lam, P.Y., and Maas, R.L. (1996). Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4213-4218.

Erickson, M.R., Galletta, B.J., and Abmayr, S.M. (1997). *Drosophila* *myoblast city* encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol* **138**, 589-603.

Eriksson, M., Ansved, T., Edstrom, L., Wells, D.J., Watt, D.J., Anvret, M., and Carey, N. (2000). Independent regulation of the myotonic dystrophy 1 locus genes postnatally and during adult skeletal muscle regeneration. *J. Biol. Chem.* **275**, 19964-19969.

Eriksson, M., Hedberg, B., Carey, N., and Ansved, T. (2001). Decreased DMPK transcript levels in myotonic dystrophy 1 type IIA muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 1177-1182.

Faenza, I., Blalock, W., Bavelloni, A., Schoser, B., Fiume, R., Pacella, S., Piazzini, M., D'Angelo, A., and Cocco, L. (2012). A role for PLCbeta1 in myotonic dystrophies type 1 and 2. *FASEB J* **26**, 3042-3048.

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

- Faustino, N.A., and Cooper, T.A. (2005). Identification of putative new splicing targets for ETR-3 using sequences identified by systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Mol Cell Biol* 25, 879-887.
- Feala, J.D., Coquin, L., McCulloch, A.D., and Paternostro, G. (2007). Flexibility in energy metabolism supports hypoxia tolerance in *Drosophila* flight muscle: metabolomic and computational systems analysis. *Mol Syst Biol* 3, 99.
- Fernandez-Costa, J.M., Garcia-Lopez, A., Zuniga, S., Fernandez-Pedrosa, V., Felipo-Benavent, A., Mata, M., Jaka, O., Aiastui, A., Hernandez-Torres, F., Aguado, B., et al. (2012). Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in *Drosophila* that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum. Mol. Genet.*
- Figeac, N., Daczewska, M., Marcelle, C., and Jagla, K. (2007). Muscle stem cells and model systems for their investigation. *Dev Dyn* 236, 3332-3342.
- Filardo, P., and Ephrussi, A. (2003). Bruno regulates gurken during *Drosophila* oogenesis. *Mech Dev* 120, 289-297.
- Filippova, G.N., Thienes, C.P., Penn, B.H., Cho, D.H., Hu, Y.J., Moore, J.M., Klesert, T.R., Lobanenko, V.V., and Tapscott, S.J. (2001). CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat. Genet.* 28, 335-343.
- Fishman, M.C., and Chien, K.R. (1997). Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development* 124, 2099-2117.
- Foiry, L., Dong, L., Savouret, C., Hubert, L., te Riele, H., Junien, C., and Gourdon, G. (2006). Msh3 is a limiting factor in the formation of intergenerational CTG expansions in DM1 transgenic mice. *Hum. Genet.* 119, 520-526.
- Fortune, M.T., Vassilopoulos, C., Coolbaugh, M.I., Siciliano, M.J., and Monckton, D.G. (2000). Dramatic, expansion-biased, age-dependent, tissue-specific somatic mosaicism in a transgenic mouse model of triplet repeat instability. *Hum. Mol. Genet.* 9, 439-445.
- Frasch, M. (1995). Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 374, 464-467.
- Frasch, M., Hoey, T., Rushlow, C., Doyle, H., and Levine, M. (1987). Characterization and localization of the even-skipped protein of *Drosophila*. *EMBO J* 6, 749-759.
- Frisch, R., Singleton, K.R., Moses, P.A., Gonzalez, I.L., Carango, P., Marks, H.G., and Funanage, V.L. (2001). Effect of triplet repeat expansion on chromatin structure and expression of DMPK and neighboring genes, SIX5 and DMWD, in myotonic dystrophy. *Mol Genet Metab* 74, 281-291.
- Fu, Y.H., Friedman, D.L., Richards, S., Pearlman, J.A., Gibbs, R.A., Pizzuti, A., Ashizawa, T., Perryman, M.B., Scarlato, G., Fenwick, R.G., Jr., et al. (1993). Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* 260, 235-238.
- Fu, Y.H., Pizzuti, A., Fenwick, R.G., Jr., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P.W., Dubel, J., Nasser, G.A., Ashizawa, T., de Jong, P., et al. (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255, 1256-1258.
- 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.
- Furling, D., Coiffier, L., Mouly, V., Barbet, J.P., St Guily, J.L., Taneja, K., Gourdon, G., Junien, C., and Butler-Browne, G.S. (2001a). Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2079-2087.

- Furling, D., Lemieux, D., Taneja, K., and Puymirat, J. (2001b). Decreased levels of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and delayed differentiation in human myotonic dystrophy myoblasts. *Neuromuscul Disord* *11*, 728-735.
- Gajewski, K., Choi, C.Y., Kim, Y., and Schulz, R.A. (2000). Genetically distinct cardiac cells within the *Drosophila* heart. *Genesis* *28*, 36-43.
- Gajewski, K., Fossett, N., Molkenstin, J.D., and Schulz, R.A. (1999). The zinc finger proteins Pannier and GATA4 function as cardiogenic factors in *Drosophila*. *Development* *126*, 5679-5688.
- Gajewski, K., Kim, Y., Lee, Y.M., Olson, E.N., and Schulz, R.A. (1997). D-mef2 is a target for Tinman activation during *Drosophila* heart development. *EMBO J* *16*, 515-522.
- Gajewski, K., Zhang, Q., Choi, C.Y., Fossett, N., Dang, A., Kim, Y.H., Kim, Y., and Schulz, R.A. (2001). Pannier is a transcriptional target and partner of Tinman during *Drosophila* cardiogenesis. *Dev Biol* *233*, 425-436.
- 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.
- Garcia-Lopez, A., Llamusi, B., Orzaez, M., Perez-Paya, E., and Artero, R.D. (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*, 11866-11871.
- Garcia-Lopez, A., Monferrer, L., Garcia-Alcover, I., Vicente-Crespo, M., Alvarez-Abril, M.C., and Artero, R.D. (2008). Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in *Drosophila*. *PLoS ONE* *3*, e1595.
- Garcia-Martinez, V., and Schoenwolf, G.C. (1993). Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Dev Biol* *159*, 706-719.
- Gildor, B., Massarwa, R., Shilo, B.Z., and Schejter, E.D. (2009). The SCAR and WASp nucleation-promoting factors act sequentially to mediate *Drosophila* myoblast fusion. *EMBO Rep* *10*, 1043-1050.
- Goers, E.S., Purcell, J., Voelker, R.B., Gates, D.P., and Berglund, J.A. (2010). MBNL1 binds GC motifs embedded in pyrimidines to regulate alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* *38*, 2467-2484.
- Goers, E.S., Voelker, R.B., Gates, D.P., and Berglund, J.A. (2008). RNA binding specificity of *Drosophila* muscleblind. *Biochemistry* *47*, 7284-7294.
- 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.
- Good, P.J., Chen, Q., Warner, S.J., and Herring, D.C. (2000). A family of human RNA-binding proteins related to the *Drosophila* Bruno translational regulator. *J. Biol. Chem.* *275*, 28583-28592.
- Grimby, G., Hedberg, M., Henriksson, K.G., Johansson, G., Wigerstad-Lossing, I., Sellden, U., and Orndahl, G. (1988). Muscle function and morphology in myotonic dystrophy. *Acta. Med. Scand.* *224*, 349-356.
- Groh, S., Zong, H., Goddeeris, M.M., Lebakken, C.S., Venzke, D., Pessin, J.E., and Campbell, K.P. (2009). Sarcoglycan complex: implications for metabolic defects in muscular dystrophies. *J Biol Chem* *284*, 19178-19182.

- Groh, W.J., Groh, M.R., Saha, C., Kincaid, J.C., Simmons, Z., Ciafaloni, E., Pourmand, R., Otten, R.F., Bhakta, D., Nair, G.V., et al. (2008). Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type 1. *N Engl J Med* 358, 2688-2697.
- Guglielmi, V., Vattermi, G., Gualandi, F., Voermans, N.C., Marini, M., Scotton, C., Pegoraro, E., Oosterhof, A., Kosa, M., Zador, E., et al. (2013). SERCA1 protein expression in muscle of patients with Brody disease and Brody syndrome and in cultured human muscle fibers. *Mol Genet Metab* 110, 162-169.
- Guiraud-Dogan, C., Huguet, A., Gomes-Pereira, M., Brisson, E., Bassez, G., Junien, C., and Gourdon, G. (2007). DM1 CTG expansions affect insulin receptor isoforms expression in various tissues of transgenic mice. *Biochim Biophys Acta* 1772, 1183-1191.
- Gunkel, O., Reichenbach, H., Thamm, B., Wetzell, U., Bratanow, S., Kirchhof, M., Lauer, B., Froster, U., and Schuler, G. (2000). [Late diagnosis of Curschmann-Steinert myotonic dystrophy in a female patient with dilated cardiomyopathy and in her son]. *Z Kardiol* 89, 599-605.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.
- Hamshire, M.G., Newman, E.E., Alwazzan, M., Athwal, B.S., and Brook, J.D. (1997). Transcriptional abnormality in myotonic dystrophy affects DMPK but not neighboring genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7394-7399.
- Hao, M., Akrami, K., Wei, K., De Diego, C., Che, N., Ku, J.H., Tidball, J., Graves, M.C., Shieh, P.B., and Chen, F. (2008). Muscleblind-like 2 (Mbnl2) -deficient mice as a model for myotonic dystrophy. *Dev Dyn* 237, 403-410.
- Haralalka, S., Shelton, C., Cartwright, H.N., Katzfey, E., Janzen, E., and Abmayr, S.M. (2011). Asymmetric Mbc, active Rac1 and F-actin foci in the fusion-competent myoblasts during myoblast fusion in *Drosophila*. *Development* 138, 1551-1562.
- Harley, H.G., Rundle, S.A., MacMillan, J.C., Myring, J., Brook, J.D., Crow, S., Reardon, W., Fenton, I., Shaw, D.J., and Harper, P.S. (1993). Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet* 52, 1164-1174.
- Harmon, E.B., Harmon, M.L., Larsen, T.D., Yang, J., Glasford, J.W., and Perryman, M.B. (2011). Myotonic dystrophy protein kinase is critical for nuclear envelope integrity. *J. Biol. Chem.* 286, 40296-40306.
- Hawkins, T.A., Haramis, A.P., Etard, C., Prodromou, C., Vaughan, C.K., Ashworth, R., Ray, S., Behra, M., Holder, N., Talbot, W.S., et al. (2008). The ATPase-dependent chaperoning activity of Hsp90a regulates thick filament formation and integration during skeletal muscle myofibrillogenesis. *Development* 135, 1147-1156.
- Hermans, M.C., Faber, C.G., Bekkers, S.C., de Die-Smulders, C.E., Gerrits, M.M., Merckies, I.S., Snoep, G., Pinto, Y.M., and Schalla, S. (2012). Structural and functional cardiac changes in myotonic dystrophy type 1: a cardiovascular magnetic resonance study. *J Cardiovasc Magn Reson* 14, 48.
- Hernandez-Hernandez, O., Guiraud-Dogan, C., Sicot, G., Huguet, A., Lullier, S., Steidl, E., Saenger, S., Marciniak, E., Obriot, H., Chevarin, C., et al. (2013). Myotonic dystrophy CTG expansion affects synaptic vesicle proteins, neurotransmission and mouse behaviour. *Brain* 136, 957-970.
- Hino, S., Kondo, S., Sekiya, H., Saito, A., Kanemoto, S., Murakami, T., Chihara, K., Aoki, Y., Nakamori, M., Takahashi, M.P., et al. (2007). Molecular mechanisms responsible for aberrant splicing of SERCA1 in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* 16, 2834-2843.

- Hirsinger, E., Malapert, P., Dubrulle, J., Delfini, M.C., Duprez, D., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Pourquie, O. (2001). Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation. *Development* 128, 107-116.
- Ho, T.H., Bundman, D., Armstrong, D.L., and Cooper, T.A. (2005a). Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1539-1547.
- Ho, T.H., Savkur, R.S., Poulos, M.G., Mancini, M.A., Swanson, M.S., and Cooper, T.A. (2005b). Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy. *J. Cell. Sci.* 118, 2923-2933.
- Hortemo, K.H., Munkvik, M., Lunde, P.K., and Sejersted, O.M. (2013). Multiple Causes of Fatigue during Shortening Contractions in Rat Slow Twitch Skeletal Muscle. *PLoS One* 8, e71700.
- Houseley, J.M., Wang, Z., Brock, G.J., Soloway, J., Artero, R., Perez-Alonso, M., O'Dell, K.M., and Monckton, D.G. (2005). Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* 14, 873-883.
- Houzelstein, D., Auda-Boucher, G., Cheraud, Y., Rouaud, T., Blanc, I., Tajbakhsh, S., Buckingham, M.E., Fontaine-Perus, J., and Robert, B. (1999). The homeobox gene *Msx1* is expressed in a subset of somites, and in muscle progenitor cells migrating into the forelimb. *Development* 126, 2689-2701.
- Huguet, A., Medja, F., Nicole, A., Vignaud, A., Guiraud-Dogan, C., Ferry, A., Decostre, V., Hogrel, J.Y., Metzger, F., Hoeflich, 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.
- 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 1 (DM1) cells. *FASEB J* 24, 3706-3719.
- Hutcheson, D.A., Zhao, J., Merrell, A., Haldar, M., and Kardon, G. (2009). Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for beta-catenin. *Genes Dev* 23, 997-1013.
- Iakova, P., Wang, G.L., Timchenko, L., Michalak, M., Pereira-Smith, O.M., Smith, J.R., and Timchenko, N.A. (2004). Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate. *EMBO J* 23, 406-417.
- Icardo, J.M. (1996). Developmental biology of the vertebrate heart. *J Exp Zool* 275, 144-161.
- Inukai, A., Doyu, M., Kato, T., Liang, Y., Kuru, S., Yamamoto, M., Kobayashi, Y., and Sobue, G. (2000). Reduced expression of DMAHP/SIX5 gene in myotonic dystrophy muscle. *Muscle Nerve* 23, 1421-1426.
- Ip, Y.T., Park, R.E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K., and Levine, M. (1992). dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 6, 1518-1530.
- Irion, U. (2012). *Drosophila* muscleblind codes for proteins with one and two tandem zinc finger motifs. *PLoS One* 7, e34248.
- Iyer, R.R., and Wells, R.D. (1999). Expansion and deletion of triplet repeat sequences in *Escherichia coli* occur on the leading strand of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 274, 3865-3877.

- Jagla, K., Frasch, M., Jagla, T., Dretzen, G., Bellard, F., and Bellard, M. (1997). ladybird, a new component of the cardiogenic pathway in *Drosophila* required for diversification of heart precursors. *Development* *124*, 3471-3479.
- Jagla, T., Bellard, F., Lutz, Y., Dretzen, G., Bellard, M., and Jagla, K. (1998). ladybird determines cell fate decisions during diversification of *Drosophila* somatic muscles. *Development* *125*, 3699-3708.
- Jagla, T., Bidet, Y., Da Ponte, J.P., Dastugue, B., and Jagla, K. (2002). Cross-repressive interactions of identity genes are essential for proper specification of cardiac and muscular fates in *Drosophila*. *Development* *129*, 1037-1047.
- Jansen, G., Groenen, P.J., Bachner, D., Jap, P.H., Coerwinkel, M., Oerlemans, F., van den Broek, W., Gohlsch, B., Pette, D., Plomp, J.J., et al. (1996). Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat. Genet.* *13*, 316-324.
- Jansen, G., Willems, P., Coerwinkel, M., Nillesen, W., Smeets, H., Vits, L., Howeler, C., Brunner, H., and Wieringa, B. (1994). Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)_n repeat variation and selection against extreme expansion in sperm. *Am J Hum Genet* *54*, 575-585.
- 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.
- Jin, S., Shimizu, M., Balasubramanyam, A., and Epstein, H.F. (2000). Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) induces actin cytoskeletal reorganization and apoptotic-like blebbing in lens cells. *Cell Motil Cytoskeleton* *45*, 133-148.
- Jinnai, K., Mitani, M., Futamura, N., Kawamoto, K., Funakawa, I., and Itoh, K. (2013). Somatic instability of CTG repeats in the cerebellum of myotonic dystrophy type 1. *Muscle Nerve* *48*, 105-108.
- Jones, K., Wei, C., Iakova, P., Bugiardi, E., Schneider-Gold, C., Meola, G., Woodgett, J., Killian, J., Timchenko, N.A., and Timchenko, L.T. (2012). GSK3beta mediates muscle pathology in myotonic dystrophy. *J. Clin. Invest.* *122*, 4461-4472.
- Kaipa, B.R., Shao, H., Schafer, G., Trinkewitz, T., Groth, V., Liu, J., Beck, L., Bogdan, S., Abmayr, S.M., and Onel, S.F. (2013). Dock mediates Scar- and WASp-dependent actin polymerization through interaction with cell adhesion molecules in founder cells and fusion-competent myoblasts. *J Cell Sci* *126*, 360-372.
- Kaliman, P., Catalucci, D., Lam, J.T., Kondo, R., Gutierrez, J.C., Reddy, S., Palacin, M., Zorzano, A., Chien, K.R., and Ruiz-Lozano, P. (2005). Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates phospholamban and regulates calcium uptake in cardiomyocyte sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *280*, 8016-8021.
- Kaliman, P., and Llagostera, E. (2008). Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1. *Cell Signal* *20*, 1935-1941.
- Kalsotra, A., Xiao, X., Ward, A.J., Castle, J.C., Johnson, J.M., Burge, C.B., and Cooper, T.A. (2008). A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 20333-20338.
- Kaminsky, P., Brembilla-Perrot, B., Pruna, L., Poussel, M., and Chenuel, B. (2013). Age, conduction defects and restrictive lung disease independently predict cardiac events and death in myotonic dystrophy. *Int J Cardiol* *162*, 172-178.
- Kanadia, R.N., Johnstone, K.A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C.A., Esson, D., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W., and Swanson, M.S. (2003). A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* *302*, 1978-1980.

- Kanadia, R.N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S.G., Wheeler, T.M., Thornton, C.A., and Swanson, M.S. (2006). Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 11748-11753.
- Kang, S., Jaworski, A., Ohshima, K., and Wells, R.D. (1995). Expansion and deletion of CTG repeats from human disease genes are determined by the direction of replication in *E. coli*. *Nat. Genet.* *10*, 213-218.
- Kantartzis, A., Williams, G.M., Balakrishnan, L., Roberts, R.L., Surtees, J.A., and Bambara, R.A. (2012). Msh2-msh3 interferes with okazaki fragment processing to promote trinucleotide repeat expansions. *Cell Rep* *2*, 216-222.
- Karagiannides, I., Thomou, T., Tchkonia, T., Pirtskhalava, T., Kypreos, K.E., Cartwright, A., Dalagiorgou, G., Lash, T.L., Farmer, S.R., Timchenko, N.A., et al. (2006). Increased CUG triplet repeat-binding protein-1 predisposes to impaired adipogenesis with aging. *J. Biol. Chem.* *281*, 23025-23033.
- Kardon, G., Campbell, J.K., and Tabin, C.J. (2002). Local extrinsic signals determine muscle and endothelial cell fate and patterning in the vertebrate limb. *Dev Cell* *3*, 533-545.
- Kasai, Y., and Cagan, R. (2010). *Drosophila* as a tool for personalized medicine: a primer. *Per Med* *7*, 621-632.
- Katzemich, A., Liao, K.A., Czerniecki, S., and Schock, F. (2013). Alp/Enigma family proteins cooperate in Z-disc formation and myofibril assembly. *PLoS Genet* *9*, e1003342.
- Kellerer, M., Lammers, R., Ermel, B., Tippmer, S., Vogt, B., Obermaier-Kusser, B., Ullrich, A., and Haring, H.U. (1992). Distinct alpha-subunit structures of human insulin receptor A and B variants determine differences in tyrosine kinase activities. *Biochemistry* *31*, 4588-4596.
- Kesper, D.A., Stute, C., Buttgerit, D., Kreiskother, N., Vishnu, S., Fischbach, K.F., and Renkawitz-Pohl, R. (2007). Myoblast fusion in *Drosophila melanogaster* is mediated through a fusion-restricted myogenic-adhesive structure (FuRMAS). *Dev Dyn* *236*, 404-415.
- Kim-Ha, J., Kerr, K., and Macdonald, P.M. (1995). Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* *81*, 403-412.
- Kimura, T., Lueck, J.D., Harvey, P.J., Pace, S.M., Ikemoto, N., Casarotto, M.G., Dirksen, R.T., and Dulhunty, A.F. (2009). Alternative splicing of RyR1 alters the efficacy of skeletal EC coupling. *Cell Calcium* *45*, 264-274.
- Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J.D., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H., Dirksen, R.T., Takahashi, M.P., Dulhunty, A.F., and Sakoda, S. (2005). Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 2189-2200.
- Kino, Y., Washizu, C., Oma, Y., Onishi, H., Nezu, Y., Sasagawa, N., Nukina, N., and Ishiura, S. (2009). MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acids Res.* *37*, 6477-6490.
- Kirby, R.J., Hamilton, G.M., Finnegan, D.J., Johnson, K.J., and Jarman, A.P. (2001). *Drosophila* homolog of the myotonic dystrophy-associated gene, SIX5, is required for muscle and gonad development. *Curr Biol* *11*, 1044-1049.
- Klesert, T.R., Cho, D.H., Clark, J.I., Maylie, J., Adelman, J., Snider, L., Yuen, E.C., Soriano, P., and Tapscott, S.J. (2000). Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* *25*, 105-109.
- Klesert, T.R., Otten, A.D., Bird, T.D., and Tapscott, S.J. (1997). Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP. *Nat. Genet.* *16*, 402-406.

- Knirr, S., Azpiazu, N., and Frasch, M. (1999). The role of the NK-homeobox gene *slouch* (*S59*) in somatic muscle patterning. *Development* *126*, 4525-4535.
- Koebis, M., Ohsawa, N., Kino, Y., Sasagawa, N., Nishino, I., and Ishiura, S. (2011). Alternative splicing of myomesin 1 gene is aberrantly regulated in myotonic dystrophy type 1. *Genes Cells* *16*, 961-972.
- Koenig, M., Monaco, A.P., and Kunkel, L.M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* *53*, 219-228.
- Korade-Mirnic, Z., Tarleton, J., Servidei, S., Casey, R.R., Gennarelli, M., Pegoraro, E., Angelini, C., and Hoffman, E.P. (1999). Myotonic dystrophy: tissue-specific effect of somatic CTG expansions on allele-specific DMAHP/SIX5 expression. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 1017-1023.
- Koshelev, M., Sarma, S., Price, R.E., Wehrens, X.H., and Cooper, T.A. (2009). Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 1066-1075.
- Kostetskii, I., Jiang, Y., Kostetskaia, E., Yuan, S., Evans, T., and Zile, M. (1999). Retinoid signaling required for normal heart development regulates GATA-4 in a pathway distinct from cardiomyocyte differentiation. *Dev Biol* *206*, 206-218.
- Krahe, R., Ashizawa, T., Abbruzzese, C., Roeder, E., Carango, P., Giacanelli, M., Funanage, V.L., and Siciliano, M.J. (1995). Effect of myotonic dystrophy trinucleotide repeat expansion on DMPK transcription and processing. *Genomics* *28*, 1-14.
- Kroksmark, A.K., Ekstrom, A.B., Bjorck, E., and Tulinius, M. (2005). Myotonic dystrophy: muscle involvement in relation to disease type and size of expanded CTG-repeat sequence. *Dev. Med. Child. Neurol.* *47*, 478-485.
- Kucherenko, M.M., Pantoja, M., Yatsenko, A.S., Shcherbata, H.R., Fischer, K.A., Maksymiv, D.V., Chernyk, Y.I., and Ruohola-Baker, H. (2008). Genetic modifier screens reveal new components that interact with the *Drosophila* dystroglycan-dystrophin complex. *PLoS One* *3*, e2418.
- 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.
- Labeit, S., and Kolmerer, B. (1995). Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* *270*, 293-296.
- Ladd, A.N., Charlet, N., and Cooper, T.A. (2001). The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol Cell Biol* *21*, 1285-1296.
- Ladd, A.N., Nguyen, N.H., Malhotra, K., and Cooper, T.A. (2004). CELF6, a member of the CELF family of RNA-binding proteins, regulates muscle-specific splicing enhancer-dependent alternative splicing. *J. Biol. Chem.* *279*, 17756-17764.
- Ladd, A.N., Yatskievych, T.A., and Antin, P.B. (1998). Regulation of avian cardiac myogenesis by activin/TGFbeta and bone morphogenetic proteins. *Dev Biol* *204*, 407-419.
- Lai, Z.C., Fortini, M.E., and Rubin, G.M. (1991). The embryonic expression patterns of *zfh-1* and *zfh-2*, two *Drosophila* genes encoding novel zinc-finger homeodomain proteins. *Mech Dev* *34*, 123-134.
- Landgraf, M., and Thor, S. (2006). Development and structure of motoneurons. *Int Rev Neurobiol* *75*, 33-53.

- Laurent, F.X., Sureau, A., Klein, A.F., Trouslard, F., Gasnier, E., Furling, D., and Marie, J. (2012). New function for the RNA helicase p68/DDX5 as a modifier of MBNL1 activity on expanded CUG repeats. *Nucleic Acids Res.* *40*, 3159-3171.
- Lavedan, C., Hofmann-Radvanyi, H., Rabes, J.P., Roume, J., and Junien, C. (1993). Different sex-dependent constraints in CTG length variation as explanation for congenital myotonic dystrophy. *Lancet* *341*, 237.
- Lazarus, A., Varin, J., Babuty, D., Anselme, F., Coste, J., and Duboc, D. (2002). Long-term follow-up of arrhythmias in patients with myotonic dystrophy treated by pacing: a multicenter diagnostic pacemaker study. *J Am Coll Cardiol* *40*, 1645-1652.
- Le Mee, G., Ezzeddine, N., Capri, M., and Ait-Ahmed, O. (2008). Repeat length and RNA expression level are not primary determinants in CUG expansion toxicity in *Drosophila* models. *PLoS One* *3*, e1466.
- Le Tonqueze, O., Gschloessl, B., Namanda-Vanderbeken, A., Legagneux, V., Paillard, L., and Audic, Y. (2010). Chromosome wide analysis of CUGBP1 binding sites identifies the tetraspanin CD9 mRNA as a target for CUGBP1-mediated down-regulation. *Biochem Biophys Res Commun* *394*, 884-889.
- Lee, H.H., and Frasch, M. (2000). Wingless effects mesoderm patterning and ectoderm segmentation events via induction of its downstream target sloppy paired. *Development* *127*, 5497-5508.
- Lee, J.E., Lee, J.Y., Wilusz, J., Tian, B., and Wilusz, C.J. (2010). Systematic analysis of cis-elements in unstable mRNAs demonstrates that CUGBP1 is a key regulator of mRNA decay in muscle cells. *PLoS One* *5*, e11201.
- Lee, T.M., Maurer, M.S., Karbassi, I., Braastad, C., Batish, S.D., and Chung, W.K. (2012). Severe dilated cardiomyopathy in a patient with myotonic dystrophy type 2 and homozygous repeat expansion in ZNF9. *Congest Heart Fail* *18*, 183-186.
- Leeflang, E.P., and Arnheim, N. (1995). A novel repeat structure at the myotonic dystrophy locus in a 37 repeat allele with unexpectedly high stability. *Hum. Mol. Genet.* *4*, 135-136.
- Lehmacher, C., Abeln, B., and Paululat, A. (2012). The ultrastructure of *Drosophila* heart cells. *Arthropod Struct Dev* *41*, 459-474.
- Leptin, M. (1991). twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev* *5*, 1568-1576.
- Leptin, M., and Grunewald, B. (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* *110*, 73-84.
- Lia, A.S., Seznec, H., Hofmann-Radvanyi, H., Radvanyi, F., Duros, C., Saquet, C., Blanche, M., Junien, C., and Gourdon, G. (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.
- 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.
- Liquori, C.L., Ricker, K., Moseley, M.L., Jacobsen, J.F., Kress, W., Naylor, S.L., Day, J.W., and Ranum, L.P. (2001). Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* *293*, 864-867.
- Liu, H., Shao, Y., Qin, W., Runyan, R.B., Xu, M., Ma, Z., Borg, T.K., Markwald, R., and Gao, B.Z. (2013). Myosin filament assembly onto myofibrils in live neonatal cardiomyocytes observed by TPEF-SHG microscopy. *Cardiovasc Res* *97*, 262-270.

- Llagostera, E., Catalucci, D., Marti, L., Liesa, M., Camps, M., Ciaraldi, T.P., Kondo, R., Reddy, S., Dillmann, W.H., Palacin, M., et al. (2007). Role of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) in glucose homeostasis and muscle insulin action. *PLoS ONE* 2, e1134.
- Llamusi, B., Bargiela, A., Fernandez-Costa, J.M., Garcia-Lopez, A., Klima, R., Feiguin, F., and Artero, R. (2012). Muscleblind, BSF and TBPH are mislocalized in the muscle sarcomere of a *Drosophila* myotonic dystrophy model. *Dis Model Mech* 6, 184-196.
- Lo, P.C., and Frasch, M. (2001). A role for the COUP-TF-related gene seven-up in the diversification of cardioblast identities in the dorsal vessel of *Drosophila*. *Mech Dev* 104, 49-60.
- Lo, P.C., Skeath, J.B., Gajewski, K., Schulz, R.A., and Frasch, M. (2002). Homeotic genes autonomously specify the anteroposterior subdivision of the *Drosophila* dorsal vessel into aorta and heart. *Dev Biol* 251, 307-319.
- Lopez Castel, A., Nakamori, M., Tome, S., Chitayat, D., Gourdon, G., Thornton, C.A., and Pearson, C.E. (2011). Expanded CTG repeat demarcates a boundary for abnormal CpG methylation in myotonic dystrophy patient tissues. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1-15.
- Lovato, T.L., Nguyen, T.P., Molina, M.R., and Cripps, R.M. (2002). The Hox gene abdominal-A specifies heart cell fate in the *Drosophila* dorsal vessel. *Development* 129, 5019-5027.
- Lueck, J.D., Lungu, C., Mankodi, A., Osborne, R.J., Welle, S.L., Dirksen, R.T., and Thornton, C.A. (2007a). Chloride channelopathy in myotonic dystrophy resulting from loss of posttranscriptional regulation for CLCN1. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1291-1297.
- Lueck, J.D., Mankodi, A., Swanson, M.S., Thornton, C.A., and Dirksen, R.T. (2007b). Muscle chloride channel dysfunction in two mouse models of myotonic dystrophy. *J Gen Physiol* 129, 79-94.
- Lyons, G.E. (1996). Vertebrate heart development. *Curr Opin Genet Dev* 6, 454-460.
- Machuca-Tzili, L., Thorpe, H., Robinson, T.E., Sewry, C., and Brook, J.D. (2006). Flies deficient in Muscleblind protein model features of myotonic dystrophy with altered splice forms of Z-band associated transcripts. *Hum. Genet.* 120, 487-499.
- Machuca-Tzili, L.E., Buxton, S., Thorpe, A., Timson, C.M., Wigmore, P., Luther, P.K., and Brook, J.D. (2011). Zebrafish deficient for Muscleblind-like 2 exhibit features of myotonic dystrophy. *Dis Model Mech* 4, 381-392.
- 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.
- Mahadevan, M.S., Yadava, R.S., Yu, Q., Balijepalli, S., Frenzel-McCardell, C.D., Bourne, T.D., and Phillips, L.H. (2006). Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* 38, 1066-1070.
- Mammarella, A., Ferroni, P., Paradiso, M., Martini, F., Paoletti, V., Morino, S., Antonini, G., Gazzaniga, P.P., Musca, A., and Basili, S. (2002). Tumor necrosis factor-alpha and myocardial function in patients with myotonic dystrophy type 1. *J Neurol Sci* 201, 59-64.
- 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.
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., and Thornton, C.A. (2000). Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289, 1769-1773.
- Mankodi, A., Takahashi, M.P., Jiang, H., Beck, C.L., Bowers, W.J., Moxley, R.T., Cannon, S.C., and Thornton, C.A. (2002). Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1

- chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol. Cell.* *10*, 35-44.
- Mankodi, A., Teng-Umnuay, P., Krym, M., Henderson, D., Swanson, M., and Thornton, C.A. (2003). Ribonuclear inclusions in skeletal muscle in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Ann Neurol* *54*, 760-768.
- Mankodi, A., Urbinati, C.R., Yuan, Q.P., Moxley, R.T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M.S., and Thornton, C.A. (2001). Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 2165-2170.
- Marcelle, C., Stark, M.R., and Bronner-Fraser, M. (1997). Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite. *Development* *124*, 3955-3963.
- Marics, I., Padilla, F., Guillemot, J.F., Scaal, M., and Marcelle, C. (2002). FGFR4 signaling is a necessary step in limb muscle differentiation. *Development* *129*, 4559-4569.
- Marquis, J., Paillard, L., Audic, Y., Cosson, B., Danos, O., Le Bec, C., and Osborne, H.B. (2006). CUG-BP1/CELF1 requires UGU-rich sequences for high-affinity binding. *Biochem J* *400*, 291-301.
- Martorell, L., Monckton, D.G., Gamez, J., Johnson, K.J., Gich, I., Lopez de Munain, A., and Baiget, M. (1998). Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients. *Hum. Mol. Genet.* *7*, 307-312.
- Marvin, M.J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S.M., and Lassar, A.B. (2001). Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev* *15*, 316-327.
- Massarwa, R., Carmon, S., Shilo, B.Z., and Schejter, E.D. (2007). WIP/WASp-based actin-polymerization machinery is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Cell* *12*, 557-569.
- Masuda, A., Andersen, H.S., Doktor, T.K., Okamoto, T., Ito, M., Andresen, B.S., and Ohno, K. (2012). CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci. Rep.* *2*, 209.
- Mathieu, J., Allard, P., Potvin, L., Prevost, C., and Begin, P. (1999). A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy. *Neurology* *52*, 1658-1662.
- Maynard, J.A., Cooper, R.R., and Ionaescu, V.V. (1977). An ultrastructure investigation of intrafusal muscle fibers in myotonic dystrophy. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.* *373*, 1-13.
- McLear, J.A., Lebrecht, D., Messer, A., and Wolfgang, W.J. (2008). Combinational approach of intrabody with enhanced Hsp70 expression addresses multiple pathologies in a fly model of Huntington's disease. *FASEB J* *22*, 2003-2011.
- Michelson, A.M., Gisselbrecht, S., Buff, E., and Skeath, J.B. (1998). Heartbroken is a specific downstream mediator of FGF receptor signalling in *Drosophila*. *Development* *125*, 4379-4389.
- Millay, D.P., O'Rourke, J.R., Sutherland, L.B., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2013). Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* *499*, 301-305.
- Miller, J.W., Urbinati, C.R., Teng-Umnuay, 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.
- Milne, C.A., and Hodgkin, J. (1999). ETR-1, a homologue of a protein linked to myotonic dystrophy, is essential for muscle development in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* *9*, 1243-1246.

- Mladenovic, J., Pekmezovic, T., Todorovic, S., Rakocevic-Stojanovic, V., Savic, D., Romac, S., and Apostolski, S. (2006). Survival and mortality of myotonic dystrophy type 1 (Steiner's disease) in the population of Belgrade. *Eur J Neurol* *13*, 451-454.
- Molina, M.R., and Cripps, R.M. (2001). Ostia, the inflow tracts of the *Drosophila* heart, develop from a genetically distinct subset of cardiac cells. *Mech Dev* *109*, 51-59.
- Monckton, D.G., Coolbaugh, M.I., Ashizawa, K.T., Siciliano, M.J., and Caskey, C.T. (1997). Hypermutable myotonic dystrophy CTG repeats in transgenic mice. *Nat. Genet.* *15*, 193-196.
- Mooers, B.H., Logue, J.S., and Berglund, J.A. (2005). The structural basis of myotonic dystrophy from the crystal structure of CUG repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 16626-16631.
- Moraes, K.C., Wilusz, C.J., and Wilusz, J. (2006). CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase. *RNA* *12*, 1084-1091.
- Morales, F., Couto, J.M., Higham, C.F., Hogg, G., Cuenca, P., Braida, C., Wilson, R.H., Adam, B., del Valle, G., Brian, R., et al. (2012). Somatic instability of the expanded CTG triplet repeat in myotonic dystrophy type 1 is a heritable quantitative trait and modifier of disease severity. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 3558-3567.
- Mori, D., Sasagawa, N., Kino, Y., and Ishiura, S. (2008). Quantitative analysis of CUG-BP1 binding to RNA repeats. *J Biochem* *143*, 377-383.
- Morner, S., Lindqvist, P., Mellberg, C., Olofsson, B.O., Backman, C., Henein, M., Lundblad, D., and Forsberg, H. (2010). Profound cardiac conduction delay predicts mortality in myotonic dystrophy type 1. *J Intern Med* *268*, 59-65.
- Mounsey, J.P., John, J.E., 3rd, Helmke, S.M., Bush, E.W., Gilbert, J., Roses, A.D., Perryman, M.B., Jones, L.R., and Moorman, J.R. (2000). Phospholemman is a substrate for myotonic dystrophy protein kinase. *J. Biol. Chem.* *275*, 23362-23367.
- Muranyi, A., Zhang, R., Liu, F., Hirano, K., Ito, M., Epstein, H.F., and Hartshorne, D.J. (2001). Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity. *FEBS Lett* *493*, 80-84.
- Muraoka, H., Negoro, N., Terasaki, F., Nakakoji, T., Kojima, S., Hoshiga, M., Sugino, M., Hosokawa, T., Ishihara, T., and Hanafusa, T. (2005). Re-entry circuit in ventricular tachycardia due to focal fatty-fibrosis in a patient with myotonic dystrophy. *Intern Med* *44*, 129-135.
- 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.
- Nakamori, M., Kimura, T., Fujimura, H., Takahashi, M.P., and Sakoda, S. (2007). Altered mRNA splicing of dystrophin in type 1 myotonic dystrophy. *Muscle Nerve* *36*, 251-257.
- Nakamori, M., Kimura, T., Kubota, T., Matsumura, T., Sumi, H., Fujimura, H., Takahashi, M.P., and Sakoda, S. (2008). Aberrantly spliced alpha-dystrobrevin alters alpha-syntrophin binding in myotonic dystrophy type 1. *Neurology* *70*, 677-685.
- Nakamori, M., Pearson, C.E., and Thornton, C.A. (2010). Bidirectional transcription stimulates expansion and contraction of expanded (CTG)ⁿ(CAG) repeats. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 580-588.
- Nakamori, M., Sobczak, K., Puwanant, A., Welle, S., Eichinger, K., Pandya, S., Dekdebrun, J., Heatwole, C.R., McDermott, M.P., Chen, T., et al. (2013). Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy. *Ann Neurol*.

- Nakamura, A., Sato, K., and Hanyu-Nakamura, K. (2004). Drosophila cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA translation in oogenesis. *Dev. Cell.* **6**, 69-78.
- Nguyen, H.H., Wolfe, J.T., 3rd, Holmes, D.R., Jr., and Edwards, W.D. (1988). Pathology of the cardiac conduction system in myotonic dystrophy: a study of 12 cases. *J Am Coll Cardiol* **11**, 662-671.
- Nolan, K.M., Barrett, K., Lu, Y., Hu, K.Q., Vincent, S., and Settleman, J. (1998). Myoblast city, the Drosophila homolog of DOCK180/CED-5, is required in a Rac signaling pathway utilized for multiple developmental processes. *Genes Dev* **12**, 3337-3342.
- Nowak, S.J., Nahirney, P.C., Hadjantonakis, A.K., and Baylies, M.K. (2009). Nap1-mediated actin remodeling is essential for mammalian myoblast fusion. *J Cell Sci* **122**, 3282-3293.
- Nucciotti, V., Stringari, C., Sacconi, L., Vanzi, F., Fusi, L., Linari, M., Piazzesi, G., Lombardi, V., and Pavone, F.S. (2010). Probing myosin structural conformation in vivo by second-harmonic generation microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 7763-7768.
- O'Coilain, D.F., Perez-Terzic, C., Reyes, S., Kane, G.C., Behfar, A., Hodgson, D.M., Strommen, J.A., Liu, X.K., van den Broek, W., Wansink, D.G., et al. (2004). Transgenic overexpression of human DMPK accumulates into hypertrophic cardiomyopathy, myotonic myopathy and hypotension traits of myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2505-2518.
- Ocorr, K., Fink, M., Cammarato, A., Bernstein, S., and Bodmer, R. (2009). Semi-automated Optical Heartbeat Analysis of small hearts. *J Vis Exp*.
- Ocorr, K., Reeves, N.L., Wessells, R.J., Fink, M., Chen, H.S., Akasaka, T., Yasuda, S., Metzger, J.M., Giles, W., Posakony, J.W., et al. (2007). KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in Drosophila that mimic the effects of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 3943-3948.
- Odermatt, A., Barton, K., Khanna, V.K., Mathieu, J., Escolar, D., Kuntzer, T., Karpati, G., and MacLennan, D.H. (2000). The mutation of Pro789 to Leu reduces the activity of the fast-twitch skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA1) and is associated with Brody disease. *Hum. Genet.* **106**, 482-491.
- Odermatt, A., Taschner, P.E., Khanna, V.K., Busch, H.F., Karpati, G., Jablecki, C.K., Breuning, M.H., and MacLennan, D.H. (1996). Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, are associated with Brody disease. *Nat. Genet.* **14**, 191-194.
- Ogi, H., Suzuki, K., Ogino, Y., Kamimura, M., Miyado, M., Ying, X., Zhang, Z., Shinohara, M., Chen, Y., and Yamada, G. (2005). Ventral abdominal wall dysmorphogenesis of Msx1/Msx2 double-mutant mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **284**, 424-430.
- Ohsawa, N., Koebis, M., Suo, S., Nishino, I., and Ishiura, S. (2011). Alternative splicing of PDLIM3/ALP, for alpha-actinin-associated LIM protein 3, is aberrant in persons with myotonic dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* **409**, 64-69.
- Olofsson, B.O., Forsberg, H., Andersson, S., Bjerle, P., Henriksson, A., and Wedin, I. (1988). Electrocardiographic findings in myotonic dystrophy. *Arctic Med Res* **47 Suppl 1**, 420-422.
- Onofre-Oliveira, P.C., Santos, A.L., Martins, P.M., Ayub-Guerrieri, D., and Vainzof, M. (2012). Differential expression of genes involved in the degeneration and regeneration pathways in mouse models for muscular dystrophies. *Neuromolecular Med* **14**, 74-83.
- Orengo, J.P., Chambon, P., Metzger, D., Mosier, D.R., Snipes, G.J., and Cooper, T.A. (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**, 2646-2651.

- Otten, A.D., and Tapscott, S.J. (1995). Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 5465-5469.
- Paillard, L., Legagneux, V., and Beverley Osborne, H. (2003). A functional deadenylation assay identifies human CUG-BP as a deadenylation factor. *Biol Cell* **95**, 107-113.
- Park, M., Wu, X., Golden, K., Axelrod, J.D., and Bodmer, R. (1996). The wingless signaling pathway is directly involved in *Drosophila* heart development. *Dev Biol* **177**, 104-116.
- Patel, K., Christ, B., and Stockdale, F.E. (2002). Control of muscle size during embryonic, fetal, and adult life. *Results Probl Cell Differ* **38**, 163-186.
- Paul, S., Dansithong, W., Jog, S.P., Holt, I., Mittal, S., Brook, J.D., Morris, G.E., Comai, L., and Reddy, S. (2011). Expanded CUG repeats Dysregulate RNA splicing by altering the stoichiometry of the muscleblind 1 complex. *J. Biol. Chem.* **286**, 38427-38438.
- 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.
- 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.
- Perrin, L., Monier, B., Ponzielli, R., Astier, M., and Semeriva, M. (2004). *Drosophila* cardiac tube organogenesis requires multiple phases of Hox activity. *Dev Biol* **272**, 419-431.
- Petri, H., Vissing, J., Witting, N., Bundgaard, H., and Kober, L. (2011). Cardiac manifestations of myotonic dystrophy type 1. *Int J Cardiol* **160**, 82-88.
- Philips, A.V., Timchenko, L.T., and Cooper, T.A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* **280**, 737-741.
- Pisani, V., Panico, M.B., Terracciano, C., Bonifazi, E., Meola, G., Novelli, G., Bernardi, G., Angelini, C., and Massa, R. (2008). Preferential central nucleation of type 2 myofibers is an invariable feature of myotonic dystrophy type 2. *Muscle Nerve* **38**, 1405-1411.
- Ponzielli, R., Astier, M., Chartier, A., Gallet, A., Therond, P., and Semeriva, M. (2002). Heart tube patterning in *Drosophila* requires integration of axial and segmental information provided by the Bithorax Complex genes and hedgehog signaling. *Development* **129**, 4509-4521.
- Postigo, A.A., Ward, E., Skeath, J.B., and Dean, D.C. (1999). *zfh-1*, the *Drosophila* homologue of ZEB, is a transcriptional repressor that regulates somatic myogenesis. *Mol Cell Biol* **19**, 7255-7263.
- Poulos, M.G., Batra, R., Li, M., Yuan, Y., Zhang, C., Darnell, R.B., and Swanson, M.S. (2013). Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice. *Hum. Mol. Genet.*
- Pourquie, O. (2003). The segmentation clock: converting embryonic time into spatial pattern. *Science* **301**, 328-330.
- Powell, G.T., and Wright, G.J. (2011). *Jamb* and *jamc* are essential for vertebrate myocyte fusion. *PLoS Biol* **9**, e1001216.
- Prent, N., Green, C., Greenhalgh, C., Cisek, R., Major, A., Stewart, B., and Barzda, V. (2008). Intermyleofilament dynamics of myocytes revealed by second harmonic generation microscopy. *J Biomed Opt* **13**, 041318.
- Protasi, F., Sun, X.H., and Franzini-Armstrong, C. (1996). Formation and maturation of the calcium release apparatus in developing and adult avian myocardium. *Dev Biol* **173**, 265-278.

- Rakocevic Stojanovic, V., Peric, S., Paunic, T., Pavlovic, S., Cvitan, E., Basta, I., Peric, M., Milicev, M., and Lavrnic, D. (2013). Cardiologic predictors of sudden death in patients with myotonic dystrophy type 1. *J Clin Neurosci* 20, 1002-1006.
- Rattenbacher, B., Beisang, D., Wiesner, D.L., Jeschke, J.C., von Hohenberg, M., St Louis-Vlasova, I.A., and Bohjanen, P.R. (2010). Analysis of CUGBP1 targets identifies GU-repeat sequences that mediate rapid mRNA decay. *Mol Cell Biol* 30, 3970-3980.
- Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C., Villemain, J.P., Fischer, M.C., Jost, B., Dembele, D., Gourdon, G., Nicole, A., Duboc, D., et al. (2011). Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 840-845.
- Reddy, S., Smith, D.B., Rich, M.M., Leferovich, J.M., Reilly, P., Davis, B.M., Tran, K., Rayburn, H., Bronson, R., Cros, D., et al. (1996). Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat. Genet.* 13, 325-335.
- Reifers, F., Walsh, E.C., Leger, S., Stainier, D.Y., and Brand, M. (2000). Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (fgf8/acerebellar). *Development* 127, 225-235.
- Reim, I., and Frasch, M. (2005). The Dorsocross T-box genes are key components of the regulatory network controlling early cardiogenesis in *Drosophila*. *Development* 132, 4911-4925.
- Reis, J., Zhang, L., Cala, S., Jew, K.N., Mace, L.C., Chung, L., Moore, R.L., and Ng, Y.C. (2005). Expression of phospholemman and its association with Na⁺-K⁺-ATPase in skeletal muscle: effects of aging and exercise training. *J Appl Physiol* 99, 1508-1515.
- Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., and Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* 11, 1114-1125.
- Rhee, D., Sanger, J.M., and Sanger, J.W. (1994). The premyofibril: evidence for its role in myofibrillogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton* 28, 1-24.
- Richardson, B.E., Beckett, K., Nowak, S.J., and Baylies, M.K. (2007). SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. *Development* 134, 4357-4367.
- Ridley, A.J. (2001). Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic* 2, 303-310.
- Roberts, R., Timchenko, N.A., Miller, J.W., Reddy, S., Caskey, C.T., Swanson, M.S., and Timchenko, L.T. (1997). Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13221-13226.
- Rodriguez, A., Zhou, Z., Tang, M.L., Meller, S., Chen, J., Bellen, H., and Kimbrell, D.A. (1996). Identification of immune system and response genes, and novel mutations causing melanotic tumor formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 143, 929-940.
- Ruiz Gomez, M., and Bate, M. (1997). Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* requires numb. *Development* 124, 4857-4866.
- Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M.V., and Bate, M. (2000). *Drosophila* dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell* 102, 189-198.
- Ruiz-Gomez, M., Romani, S., Hartmann, C., Jackle, H., and Bate, M. (1997). Specific muscle identities are regulated by Kruppel during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 124, 3407-3414.

- Ryan, K.M., Hoshizaki, D.K., and Cripps, R.M. (2005). Homeotic selector genes control the patterning of seven-up expressing cells in the *Drosophila* dorsal vessel. *Mech Dev* 122, 1023-1033.
- Said, S.A.M., Baart, J.C., and Voogt, W.G.d. (2006). Pacing for conduction disturbances in Steinert's disease: a new indication for biventricular ICD? *Netherlands Heart Journal* 14, 258-262.
- Salisbury, E., Sakai, K., Schoser, B., Huichalaf, C., Schneider-Gold, C., Nguyen, H., Wang, G.L., Albrecht, J.H., and Timchenko, L.T. (2008). Ectopic expression of cyclin D3 corrects differentiation of DM1 myoblasts through activation of RNA CUG-binding protein, CUGBP1. *Exp. Cell. Res.* 314, 2266-2278.
- Samaraweera, S.E., O'Keefe, L.V., Price, G.R., Venter, D.J., and Richards, R.I. (2013). Distinct roles for Toll and autophagy pathways in double-stranded RNA toxicity in a *Drosophila* model of expanded repeat neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* 22, 2811-2819.
- Sandmann, T., Girardot, C., Brehme, M., Tongprasit, W., Stolc, V., and Furlong, E.E. (2007). A core transcriptional network for early mesoderm development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* 21, 436-449.
- Santoro, M., Piacentini, R., Masciullo, M., Bianchi, M.L., Modoni, A., Podda, M.V., Ricci, E., Silvestri, G., and Grassi, C. (2013). Alternative splicing alterations of Ca handling genes are associated with Ca signal dysregulation in DM1 and DM2 myotubes. *Neuropathol Appl Neurobiol.*
- Sanyal, S., Jennings, T., Dowse, H., and Ramaswami, M. (2006). Conditional mutations in SERCA, the Sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, alter heart rate and rhythmicity in *Drosophila*. *J. Comp. Physiol. B.* 176, 253-263.
- Sarkar, P.S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., Chai, Y., Stout, J.T., and Reddy, S. (2000). Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat. Genet.* 25, 110-114.
- Sarkar, P.S., Chang, H.C., Boudi, F.B., and Reddy, S. (1998). CTG repeats show bimodal amplification in *E. coli*. *Cell* 95, 531-540.
- Sarkar, P.S., Han, J., and Reddy, S. (2004). In situ hybridization analysis of Dmpk mRNA in adult mouse tissues. *Neuromuscul Disord* 14, 497-506.
- Sassoon, D., Lyons, G., Wright, W.E., Lin, V., Lassar, A., Weintraub, H., and Buckingham, M. (1989). Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature* 341, 303-307.
- Savkur, R.S., Philips, A.V., and Cooper, T.A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* 29, 40-47.
- Savouret, C., Brisson, E., Essers, J., Kanaar, R., Pastink, A., te Riele, H., Junien, C., and Gourdon, G. (2003). CTG repeat instability and size variation timing in DNA repair-deficient mice. *EMBO J* 22, 2264-2273.
- Schara, U., and Schoser, B.G. (2006). Myotonic dystrophies type 1 and 2: a summary on current aspects. *Semin Pediatr Neurol* 13, 71-79.
- Schneider, V.A., and Mercola, M. (2001). Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* 15, 304-315.
- Schoenwolf, G.C., and Garcia-Martinez, V. (1995). Primitive-streak origin and state of commitment of cells of the cardiovascular system in avian and mammalian embryos. *Cell Mol Biol Res* 41, 233-240.

- Schultheiss, T.M., Burch, J.B., and Lassar, A.B. (1997). A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev* *11*, 451-462.
- Schultheiss, T.M., Xydas, S., and Lassar, A.B. (1995). Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development* *121*, 4203-4214.
- Searcy, R.D., Vincent, E.B., Liberatore, C.M., and Yutzey, K.E. (1998). A GATA-dependent nkx-2.5 regulatory element activates early cardiac gene expression in transgenic mice. *Development* *125*, 4461-4470.
- Sens, K.L., Zhang, S., Jin, P., Duan, R., Zhang, G., Luo, F., Parachini, L., and Chen, E.H. (2010). An invasive podosome-like structure promotes fusion pore formation during myoblast fusion. *J Cell Biol* *191*, 1013-1027.
- Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C.A., Watzet, A., Vermersch, P., and Delacourte, A. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 2143-2155.
- Seznec, H., Agbulut, O., Sergeant, N., Savouret, C., Ghestem, A., Tabti, N., Willer, J.C., Ourth, L., Duros, C., Brisson, E., et al. (2001). Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 2717-2726.
- Shah, A.P., Nongthomba, U., Kelly Tanaka, K.K., Denton, M.L., Meadows, S.M., Bancroft, N., Molina, M.R., and Cripps, R.M. (2011). Cardiac remodeling in *Drosophila* arises from changes in actin gene expression and from a contribution of lymph gland-like cells to the heart musculature. *Mech Dev* *128*, 222-233.
- Shaw, D.J., McCurrach, M., Rundle, S.A., Harley, H.G., Crow, S.R., Sohn, R., Thirion, J.P., Hamshere, M.G., Buckler, A.J., Harper, P.S., et al. (1993). Genomic organization and transcriptional units at the myotonic dystrophy locus. *Genomics* *18*, 673-679.
- Shcherbata, H.R., Yatsenko, A.S., Patterson, L., Sood, V.D., Nudel, U., Yaffe, D., Baker, D., and Ruohola-Baker, H. (2007). Dissecting muscle and neuronal disorders in a *Drosophila* model of muscular dystrophy. *EMBO J* *26*, 481-493.
- Shelton, C., Kocherlakota, K.S., Zhuang, S., and Abmayr, S.M. (2009). The immunoglobulin superfamily member Hbs functions redundantly with Sns in interactions between founder and fusion-competent myoblasts. *Development* *136*, 1159-1168.
- Shi, Y., Downes, M., Xie, W., Kao, H.Y., Ordentlich, P., Tsai, C.C., Hon, M., and Evans, R.M. (2001). Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation. *Genes Dev* *15*, 1140-1151.
- Shih, H.P., Gross, M.K., and Kioussi, C. (2008). Muscle development: forming the head and trunk muscles. *Acta Histochem* *110*, 97-108.
- Shimizu, M., Wang, W., Walch, E.T., Dunne, P.W., and Epstein, H.F. (2000). Rac-1 and Raf-1 kinases, components of distinct signaling pathways, activate myotonic dystrophy protein kinase. *FEBS Lett* *475*, 273-277.
- Shishido, E., Ono, N., Kojima, T., and Saigo, K. (1997). Requirements of DFR1/Heartless, a mesoderm-specific *Drosophila* FGF-receptor, for the formation of heart, visceral and somatic muscles, and ensheathing of longitudinal axon tracts in CNS. *Development* *124*, 2119-2128.
- Silverman, B., Fuller, W., Eaton, P., Deng, J., Moorman, J.R., Cheung, J.Y., James, A.F., and Shattock, M.J. (2005). Serine 68 phosphorylation of phospholemman: acute isoform-specific activation of cardiac Na/K ATPase. *Cardiovasc Res* *65*, 93-103.

Sohn, R.L., Huang, P., Kawahara, G., Mitchell, M., Guyon, J., Kalluri, R., Kunkel, L.M., and Gussoni, E. (2009). A role for nephrin, a renal protein, in vertebrate skeletal muscle cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 9274-9279.

Southwell, A.L., Ko, J., and Patterson, P.H. (2009). Intrabody gene therapy ameliorates motor, cognitive, and neuropathological symptoms in multiple mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci* *29*, 13589-13602.

Sovari, A.A., and Karagueuzian, H.S. (2011). Myocardial fibrosis as a risk stratifier for sudden arrhythmic death. *Expert Rev Cardiovasc Ther* *9*, 951-953.

Sparrow, J.C., and Schock, F. (2009). The initial steps of myofibril assembly: integrins pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 293-298.

Spilker, K.A., Wang, G.J., Tugizova, M.S., and Shen, K. (2012). *Caenorhabditis elegans* Muscleblind homolog mbl-1 functions in neurons to regulate synapse formation. *Neural Dev* *7*, 7.

Srinivas, B.P., Woo, J., Leong, W.Y., and Roy, S. (2007). A conserved molecular pathway mediates myoblast fusion in insects and vertebrates. *Nat Genet* *39*, 781-786.

Stathopoulos, A., Tam, B., Ronshaugen, M., Frasch, M., and Levine, M. (2004). *pyramus* and *thisbe*: FGF genes that pattern the mesoderm of *Drosophila* embryos. *Genes Dev* *18*, 687-699.

Steinbach, P., Glaser, D., Vogel, W., Wolf, M., and Schwemmle, S. (1998). The DMPK gene of severely affected myotonic dystrophy patients is hypermethylated proximal to the largely expanded CTG repeat. *Am J Hum Genet* *62*, 278-285.

Strunkelberg, M., Bonengel, B., Moda, L.M., Hertenstein, A., de Couet, H.G., Ramos, R.G., and Fischbach, K.F. (2001). *rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development* *128*, 4229-4239.

Stuart, C.A., Armstrong, R.M., Provow, S.A., and Plishker, G.A. (1983). Insulin resistance in patients with myotonic dystrophy. *Neurology* *33*, 679-685.

Su, M.T., Fujioka, M., Goto, T., and Bodmer, R. (1999). The *Drosophila* homeobox genes *zfh-1* and *even-skipped* are required for cardiac-specific differentiation of a *numb*-dependent lineage decision. *Development* *126*, 3241-3251.

Sudol, K.L., Mastrangelo, M.A., Narrow, W.C., Frazer, M.E., Levites, Y.R., Golde, T.E., Federoff, H.J., and Bowers, W.J. (2009). Generating differentially targeted amyloid-beta specific intrabodies as a passive vaccination strategy for Alzheimer's disease. *Mol Ther* *17*, 2031-2040.

Suenaga, K., Lee, K.Y., Nakamori, M., Tatsumi, Y., Takahashi, M.P., Fujimura, H., Jinnai, K., Yoshikawa, H., Du, H., Ares, M., Jr., et al. (2012). Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain. *PLoS One* *7*, e33218.

Sugimura, I., and Lilly, M.A. (2006). Bruno inhibits the expression of mitotic cyclins during the prophase I meiotic arrest of *Drosophila* oocytes. *Dev. Cell.* *10*, 127-135.

Swank, D.M., Knowles, A.F., Suggs, J.A., Sarsoza, F., Lee, A., Maughan, D.W., and Bernstein, S.I. (2002). The myosin converter domain modulates muscle performance. *Nat Cell Biol* *4*, 312-316.

Taghli-Lamalle, O., Akasaka, T., Hogg, G., Nudel, U., Yaffe, D., Chamberlain, J.S., Ocorr, K., and Bodmer, R. (2008). Dystrophin deficiency in *Drosophila* reduces lifespan and causes a dilated cardiomyopathy phenotype. *Aging Cell* *7*, 237-249.

Tajbakhsh, S., Borello, U., Vivarelli, E., Kelly, R., Papkoff, J., Duprez, D., Buckingham, M., and Cossu, G. (1998). Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants

of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. *Development* **125**, 4155-4162.

Taneja, K.L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., and Singer, R.H. (1995). Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J. Cell. Biol.* **128**, 995-1002.

Tang, Z.Z., Yarotsky, V., Wei, L., Sobczak, K., Nakamori, M., Eichinger, K., Moxley, R.T., Dirksen, R.T., and Thornton, C.A. (2012). Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca(V)1.1 calcium channel. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1312-1324.

Tapanes-Castillo, A., and Baylies, M.K. (2004). Notch signaling patterns *Drosophila* mesodermal segments by regulating the bHLH transcription factor twist. *Development* **131**, 2359-2372.

Teplova, M., Song, J., Gaw, H.Y., Teplov, A., and Patel, D.J. (2010). Structural insights into RNA recognition by the alternate-splicing regulator CUG-binding protein 1. *Structure* **18**, 1364-1377.

Thisse, C., Perrin-Schmitt, F., Stoetzel, C., and Thisse, B. (1991). Sequence-specific transactivation of the *Drosophila* twist gene by the dorsal gene product. *Cell* **65**, 1191-1201.

Thornell, L.E., Lindstrom, M., Renault, V., Klein, A., Mouly, V., Ansved, T., Butler-Browne, G., and Furling, D. (2009). Satellite Cell Dysfunction Contributes to the Progressive Muscle Atrophy in Myotonic Dystrophy Type 1. *Neuropathol Appl Neurobiol.*

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

Tian, B., White, R.J., Xia, T., Welle, S., Turner, D.H., Mathews, M.B., and Thornton, C.A. (2000). Expanded CUG repeat RNAs form hairpins that activate the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *RNA* **6**, 79-87.

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

Timchenko, L.T., Salisbury, E., Wang, G.L., Nguyen, H., Albrecht, J.H., Hershey, J.W., and Timchenko, N.A. (2006). Age-specific CUGBP1-eIF2 complex increases translation of CCAAT/enhancer-binding protein beta in old liver. *J. Biol. Chem.* **281**, 32806-32819.

Timchenko, L.T., Timchenko, N.A., Caskey, C.T., and Roberts, R. (1996b). Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 115-121.

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

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

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

Timchenko, N.A., Wang, G.L., and Timchenko, L.T. (2005). RNA CUG-binding protein 1 increases translation of 20-kDa isoform of CCAAT/enhancer-binding protein beta by interacting with the alpha and beta subunits of eukaryotic initiation translation factor 2. *J. Biol. Chem.* **280**, 20549-20557.

- Timchenko, N.A., Welm, A.L., Lu, X., and Timchenko, L.T. (1999). CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms. *Nucleic Acids Res.* 27, 4517-4525.
- Tixier, V., Bataille, L., and Jagla, K. (2010). Diversification of muscle types: recent insights from *Drosophila*. *Exp Cell Res* 316, 3019-3027.
- Tokuyasu, K.T., and Maher, P.A. (1987). Immunocytochemical studies of cardiac myofibrillogenesis in early chick embryos. II. Generation of alpha-actinin dots within titin spots at the time of the first myofibril formation. *J Cell Biol* 105, 2795-2801.
- Tran, H., Gourrier, N., Lemercier-Neuillet, C., Dhaenens, C.M., Vautrin, A., Fernandez-Gomez, F.J., Arandel, L., Carpentier, C., Obriot, H., Eddarkaoui, S., et al. (2011). Analysis of exonic regions involved in nuclear localization, splicing activity, and dimerization of Muscleblind-like-1 isoforms. *J. Biol. Chem.* 286, 16435-16446.
- Trinick, J. (1996). Interaction of titin/connectin with the thick filament. *Adv Biophys* 33, 81-90.
- Tsilfidis, C., MacKenzie, A.E., Mettler, G., Barcelo, J., and Korneluk, R.G. (1992). Correlation between CTG trinucleotide repeat length and frequency of severe congenital myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* 1, 192-195.
- Tzahor, E., and Lassar, A.B. (2001). Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis. *Genes Dev* 15, 255-260.
- Vicente-Crespo, M., Pascual, M., Fernandez-Costa, J.M., Garcia-Lopez, A., Monferrer, L., Miranda, M.E., Zhou, L., and Artero, R.D. (2008). *Drosophila* muscleblind is involved in troponin T alternative splicing and apoptosis. *PLoS ONE* 3, e1613.
- 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.
- Vihola, A., Bassez, G., Meola, G., Zhang, S., Haapasalo, H., Paetau, A., Mancinelli, E., Rouche, A., Hogrel, J.Y., Laforet, P., et al. (2003). Histopathological differences of myotonic dystrophy type 1 (DM1) and PROMM/DM2. *Neurology* 60, 1854-1857.
- Vlasova, I.A., Tahoe, N.M., Fan, D., Larsson, O., Rattenbacher, B., Sternjohn, J.R., Vasdewani, J., Karypis, G., Reilly, C.S., Bitterman, P.B., et al. (2008). Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol. Cell.* 29, 263-270.
- Volk, T. (1999). Singling out *Drosophila* tendon cells: a dialogue between two distinct cell types. *Trends Genet* 15, 448-453.
- von zur Muhlen, F., Klass, C., Kreuzer, H., Mall, G., Giese, A., and Reimers, C.D. (1998). Cardiac involvement in proximal myotonic myopathy. *Heart* 79, 619-621.
- Wakimoto, H., Maguire, C.T., Sherwood, M.C., Vargas, M.M., Sarkar, P.S., Han, J., Reddy, S., and Berul, C.I. (2002). Characterization of cardiac conduction system abnormalities in mice with targeted disruption of Six5 gene. *J Interv Card Electrophysiol* 7, 127-135.
- Wang, E.T., Cody, N.A., Jog, S., Biancolella, M., Wang, T.T., Treacy, D.J., Luo, S., Schroth, G.P., Housman, D.E., Reddy, S., et al. (2012). Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell* 150, 710-724.
- Wang, G.S., Kearney, D.L., De Biasi, M., Taffet, G., and Cooper, T.A. (2007). Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J. Clin. Invest.* 117, 2802-2811.

- Wang, G.S., Kuyumcu-Martinez, M.N., Sarma, S., Mathur, N., Wehrens, X.H., and Cooper, T.A. (2009). PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1. *J. Clin. Invest.* **119**, 3797-3806.
- Wang, L.C., Chen, K.Y., Pan, H., Wu, C.C., Chen, P.H., Liao, Y.T., Li, C., Huang, M.L., and Hsiao, K.M. (2011). Muscleblind participates in RNA toxicity of expanded CAG and CUG repeats in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Mol Life Sci* **68**, 1255-1267.
- Wang, L.C., Hung, W.T., Pan, H., Chen, K.Y., Wu, Y.C., Liu, Y.F., and Hsiao, K.M. (2008). Growth-dependent effect of muscleblind knockdown on *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* **366**, 705-709.
- Ward, A.J., Rimer, M., Killian, J.M., Dowling, J.J., and Cooper, T.A. (2010). CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3614-3622.
- Ward, E.J., and Skeath, J.B. (2000). Characterization of a novel subset of cardiac cells and their progenitors in the *Drosophila* embryo. *Development* **127**, 4959-4969.
- Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T.K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S., et al. (1991). The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* **251**, 761-766.
- Westerlaken, J.H., Van der Zee, C.E., Peters, W., and Wieringa, B. (2003). The DMWD protein from the myotonic dystrophy (DM1) gene region is developmentally regulated and is present most prominently in synapse-dense brain areas. *Brain Res* **971**, 116-127.
- Wheeler, T.M., Lueck, J.D., Swanson, M.S., Dirksen, R.T., and Thornton, C.A. (2007). Correction of CIC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *J. Clin. Invest.* **117**, 3952-3957.
- Witt, C.C., Burkart, C., Labeit, D., McNabb, M., Wu, Y., Granzier, H., and Labeit, S. (2006). Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *EMBO J* **25**, 3843-3855.
- Wong, L.J., Ashizawa, T., Monckton, D.G., Caskey, C.T., and Richards, C.S. (1995). Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent. *Am J Hum Genet* **56**, 114-122.
- Wu, X., Golden, K., and Bodmer, R. (1995). Heart development in *Drosophila* requires the segment polarity gene wingless. *Dev Biol* **169**, 619-628.
- Xu, Y., Condell, M., Plesken, H., Edelman-Novemsky, I., Ma, J., Ren, M., and Schlame, M. (2006). A *Drosophila* model of Barth syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 11584-11588.
- 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.
- Yanowitz, J.L., Shakir, M.A., Hedgecock, E., Hutter, H., Fire, A.Z., and Lundquist, E.A. (2004). UNC-39, the *C. elegans* homolog of the human myotonic dystrophy-associated homeodomain protein Six5, regulates cell motility and differentiation. *Dev Biol* **272**, 389-402.
- Yotova, V., Labuda, D., Zietkiewicz, E., Gehl, D., Lovell, A., Lefebvre, J.F., Bourgeois, S., Lemieux-Blanchard, E., Labuda, M., Vezina, H., et al. (2005). Anatomy of a founder effect: myotonic dystrophy in Northeastern Quebec. *Hum. Genet.* **117**, 177-187.
- 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.

Zaffran, S., Astier, M., Gratecos, D., Guillen, A., and Semeriva, M. (1995). Cellular interactions during heart morphogenesis in the *Drosophila* embryo. *Biol Cell* 84, 13-24.

Zeesman, S., Carson, N., and Whelan, D.T. (2002). Paternal transmission of the congenital form of myotonic dystrophy type 1: a new case and review of the literature. *Am J Med Genet* 107, 222-226.

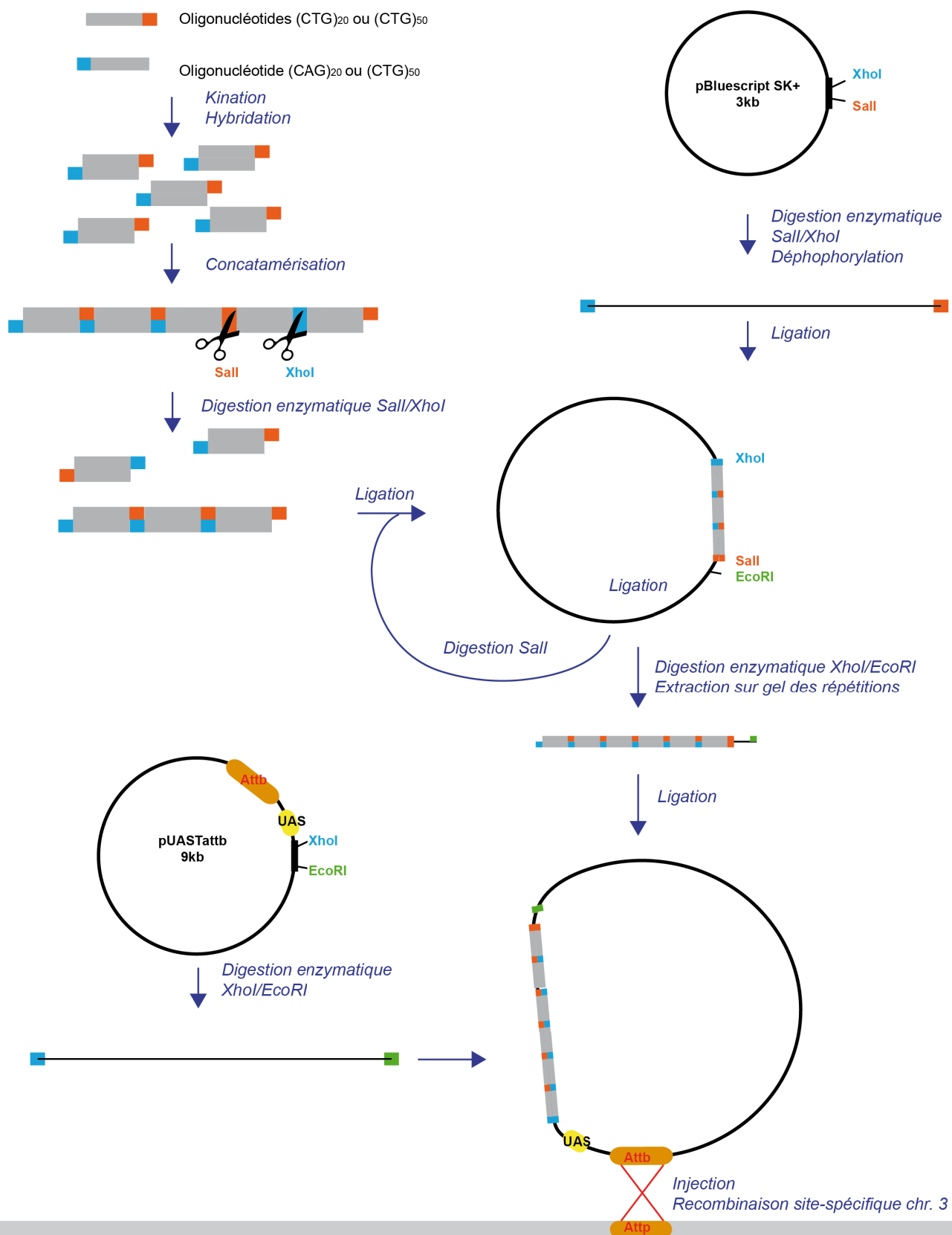
Zeitouni, B., Senatore, S., Severac, D., Aknin, C., Semeriva, M., and Perrin, L. (2007). Signalling pathways involved in adult heart formation revealed by gene expression profiling in *Drosophila*. *PLoS Genet* 3, 1907-1921.

Zhang, L., Lee, J.E., Wilusz, J., and Wilusz, C.J. (2008). The RNA-binding protein CUGBP1 regulates stability of tumor necrosis factor mRNA in muscle cells: implications for myotonic dystrophy. *J. Biol. Chem.* 283, 22457-22463.

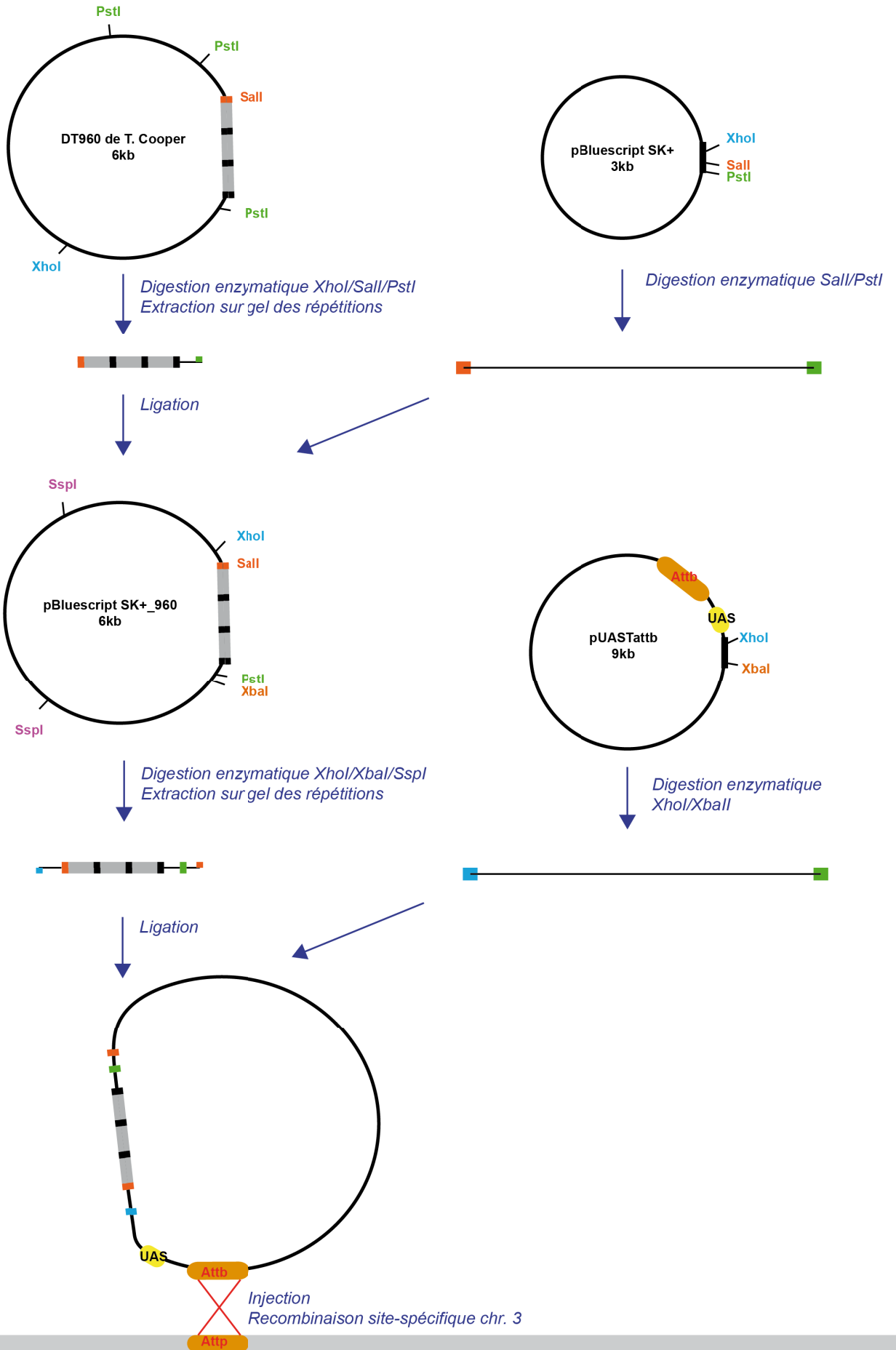
Zu, T., Gibbens, B., Doty, N.S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M.D., Margolis, J., Peterson, M., Markowski, T.W., Ingram, M.A., et al. (2011). Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 260-265.

ANNEXES

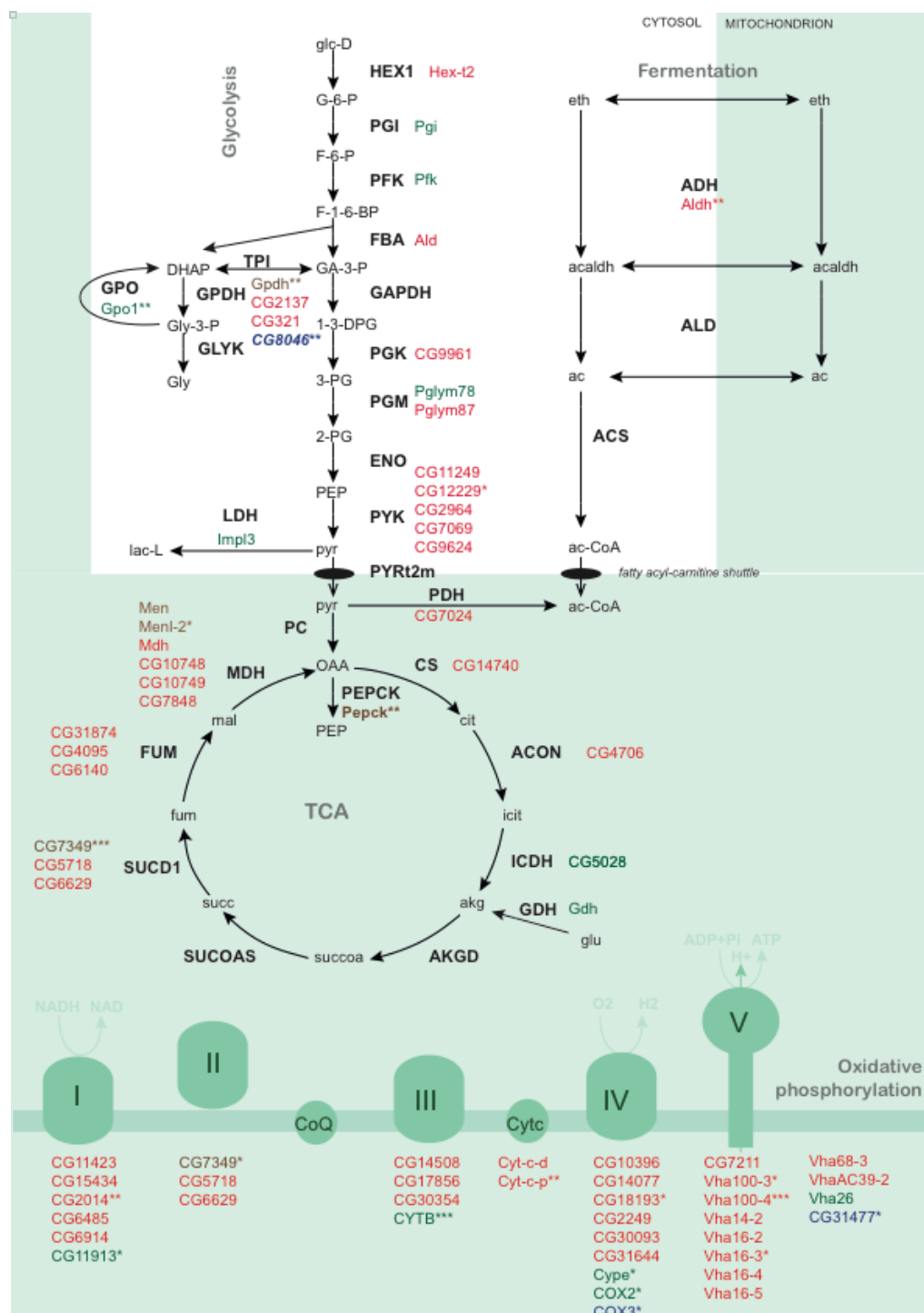
Stratégie de mise en place des lignées UAS-240CTG, UAS-480CTG, UAS-600CTG



Stratégie de mise en place de la lignée UAS-960CTG



Gènes impliqués dans le métabolisme dont l'expression est altérée sur les puces ADN



Diminution dépendant de Mbl

Diminution dépendante de Bru-3

Diminution dépendante de Mbl et Bru-3

Diminution/ Augmentation dépendante spécifiquement des CTG

* DM1₆₀₀

** DM1₉₆₀

Annexe 4. Revue publiée dans la revue « Current Pharmaceutical Design »

*Muscle development and regeneration in normal and pathological conditions:
learning from Drosophila.*

M. Daczewska, L. Picchio, T. Jagla, N. Figeac, K. Jagla

Muscle Development and Regeneration in Normal and Pathological Conditions: Learning from *Drosophila*

Malgorzata Daczewska[#], Lucie Picchio, Teresa Jagla, Nicolas Figeac and Krzysztof Jagla

GReD, INSERM U931, UMR CNRS 6247, Clermont University, 28, Place Henri-Dunant 63000 Clermont-Ferrand, France, [#]Zoology Dept, University of Wroclaw, 21, Sienkiewicza Street, 50-335 Wroclaw, Poland

Abstract: The recent demonstration that, throughout evolution, many molecular mechanisms have been highly conserved is fundamental to the advancement of our knowledge on muscle development and regeneration. Research has provided new insights into genetic cascades governing early steps of embryonic myogenesis and the regeneration of adult muscle in normal and pathological conditions, thus revealing significant similarity of both processes. Here we provide a current view on genetic mechanisms underlying muscle regeneration with a special focus on regeneration processes that take place in diseased and aging human muscle. Through examples of *Drosophila* models of human muscular diseases, we discuss potential impact they might have on uncovering molecular bases and identifying new treatments of muscle disorders. Taking advantage of evolutionarily conserved aspects of muscle development and the relative ease by which molecular pathways can be uncovered and dissected in a simple animal model, the fruit fly, we provide a comprehensive analysis of muscle development in *Drosophila*. Importantly, identification of muscle stem cell like adult muscle precursors in *Drosophila* makes fruit fly an attractive model system for studying muscle stem cell biology and muscle regeneration. In support of this assumption, recent studies in our laboratory provide arguments that important insights into the biology of vertebrate muscle stem cells can be gained from genetic analysis in *Drosophila*.

Keywords: Muscle, regeneration, muscle dystrophy, satellite cell, AMP, *Drosophila*.

CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING MUSCLE REGENERATION IN NORMAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS

Skeletal muscle is a dynamic tissue with remarkable capacity to regenerate and self-repair following exercise or injury. After muscle injury, muscle fibers undergo sequential and overlapping phases of degeneration/necrosis and regeneration to recover functional capacity. Repair process is much slower in old muscles and in muscles affected by muscular dystrophies (MD). The dysfunction of muscle tissue affected by MD occurs as a result of a reduced efficiency of muscle fiber regeneration, which actively contributes to disease progression. Diseased muscles are repaired by a population of adult muscle progenitors such as satellite cells [1]. During embryonic and foetal life, myogenic progenitors continuously proliferate and differentiate to generate the skeletal muscle masses. At the end of foetal life, progenitors relocate at the periphery of existing muscle fibers, while they progressively enter quiescence. They become embedded within the basal lamina in close contact with the muscle fibers and then serve as a population of reserve muscle stem cells called satellite cells. During post-natal growth or in response to injury or in pathological conditions, such as dystrophies, satellite cells become activated, proliferate and either fuse to form multinucleated myotubes or re-establish a residual pool of quiescent satellite cells that have the capability of supporting additional rounds of growth/regeneration. Satellite cells and embryonic muscle progenitors have been identified in a broad spectrum of vertebrate species, indicating that they are part of a conserved myogenic process. A crucial step in studying muscle stem cells was the identification of their embryonic origin. While it had been known for decades that in all vertebrates, skeletal muscles derive from segmented paraxial mesodermal structures termed somites, the origin of satellite cells remained obscure. Studies performed during the last 5 years have provided important insights in this question. As elegantly demonstrated in chick and mouse embryos [2], the

central domain of dermomyotome is the source of embryonic and foetal muscle progenitors and also of satellite cells.

Satellite cells are responsible for postnatal growth, as well as for most of the muscle repair [3]. Under normal circumstances, satellite cells are quiescent, but in response to stress, they are activated, undergo multiple rounds of proliferation and express myogenic markers [4]. Satellite cells have the capacity of self-renewal. Without this process the number of satellite cells would decline after muscle injury or in pathological condition. One of the models proposed to explain self-renewal of satellite cells is based on asymmetrical divisions [5], which result in the formation of two daughter cells. One of which remains quiescent while the other undergoes myogenic activation, differentiate into myoblast, and then fuse with one another to form new myotubes [6]. The capacity of satellite cells to self-renew has been elegantly demonstrated by the transplantation of individual fibers with their associated satellite cells from one mouse strain to another [7, 8]. The donor satellite cells were shown to expand to generate new satellite cells in the host, adopting the appropriate anatomical position, expressing the appropriate biochemical markers and most importantly, mediating subsequent regenerative responses in the host.

The paired box transcription factor Pax7 is the most commonly used marker for satellite cells in a wide range of vertebrate species (from fishes to humans). Pax7 was initially thought to be essential for the specification of satellite [4]. However, as demonstrated recently [9, 10], satellite cells are present in Pax7 mutant mice, but are then gradually lost, suggesting that Pax7 is required for satellite cell survival. Expression of the paralogue of Pax7, Pax3, has also been detected in a subset of satellite cells [10]. Because of the major deficit in skeletal muscle in double Pax3/Pax7 mutant mice [2], it has been suggested that Pax3 and Pax7 act together to specify all muscle stem cells.

The key role of asymmetric cell division in satellite cell self-renewal is supported by the existence of two subpopulations of Pax7⁺ satellite cells within adult muscles [11] (Fig. (1)). Myf5⁻/Pax7⁺ satellite cells extensively contribute to the self-renewal of the stem cell reservoir, while Myf5⁺/Pax7⁺ cells readily engage in the terminal differentiation program. Myf5⁻/Pax7⁺ satellite cells therefore constitute the true adult muscle stem cells and it was

*Address correspondence to this author at the GReD, INSERM U931, UMR CNRS 6247, Clermont University, 28, Place Henri-Dunant 63000 Clermont-Ferrand, France; E-mail: christophe.jagla@u-clermont1.fr

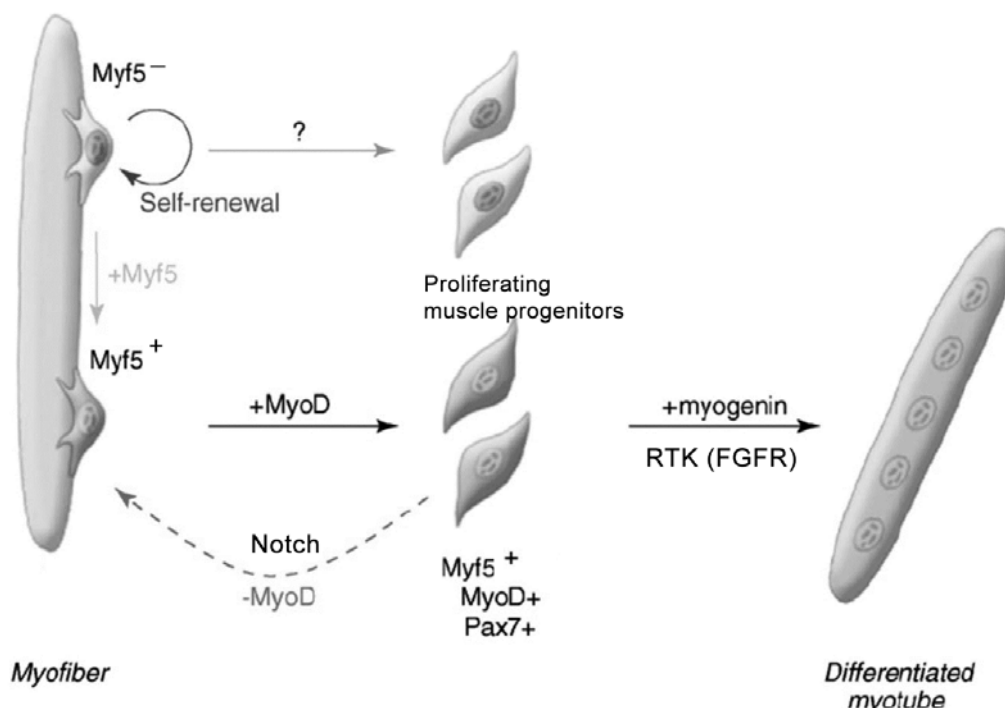


Fig. (1). Genetic pathway controlling maintenance of adult muscle stem cells and their entry into differentiation. Two subsets of adult muscle stem cells are associated with myofibers. These cells express satellite cell marker Pax7 but only fraction of them is negative for Myf5. It has been proposed that Myf5⁻/Pax7⁺ cells divide either symmetrically and contribute to self-renewal of satellite cells or asymmetrically giving rise to Myf5⁺/Pax7⁺ cells that are ready to engage into differentiation and contribute to muscle fiber formation. An important step in this pathway is the activation of MyoD and myogenin. Importantly, Notch signalling is able to repress MyoD in proliferating muscle progenitors and revert them into quiescent state of satellite cells associated with muscle fibers. In contrast, RTK signals and in particular FGFR signalling pathway promote differentiation of muscle progenitors into myotubes.

demonstrated that they generate Myf5⁺/Pax7⁺ cells through apico-basal asymmetric cell division. It has also been recently demonstrated [12] that Pax7 activates expression of target genes such as *Myf5* and *MyoD* through recruitment of the Wdr5/Ash2L/MLL2 histone methyl-transferase complex. Thus, accumulated evidence indicates that satellite stem cells represent a true stem cell reservoir. Consequently, targeting mechanisms that regulate their function represents an important therapeutic strategy for the treatment of neuromuscular diseases.

An aspect that is still poorly understood is how the signalling pathways maintain muscle stem cells undifferentiated and cycling or on the contrary induce their differentiation. Recent data indicate that Wnt, Notch and Myostatin (TGF β) pathways may be implicated in this fate choice (Fig. (1)). However, which specific step they regulate and how these pathways interact within larger gene regulatory networks are unknown. RBP-J is the major transcriptional mediator of Notch signalling. It has been previously shown that in the absence of RBP-J, embryonic muscle progenitor cells are not maintained but differentiate prematurely, leading to an early depletion of the muscle progenitor pool and to a severe reduction in muscle size [13]. A similar deficit has also been observed in mice with a hypomorphic mutation of Dll1 that encodes a Notch ligand [14]. Moreover, a functional module composed of elements of Notch and Wnt signalling was found to act as an information processing device that determines the probability with which a cell state is adopted [15,16]. The interactions between Wnt and Notch signalling, first uncovered in *Drosophila*, play a central role in the maintenance and differentiation of stem cells (reviewed in [16]) and have been shown to be of central importance in the maintenance and activation of satellite cells in muscle [17]. Understanding the molecular mechanisms of these interactions and their influence on the process of cell fate assignments will therefore

have an impact on the ability to control the proliferation and differentiation of muscle stem cells. Opposed to Notch, tyrosine kinase signalling drives myogenic progenitors towards differentiation (Fig. (1)), and affects the balance between myogenic progenitors and committed myoblasts [18]. Myostatin signalling also exerts an opposing effect on Notch signalling, since its activation induces the premature differentiation of embryonic muscle progenitors, through the activation of p21 and MyoD. This results in a severe depletion of the progenitor pool and to muscle hypotrophy. On the contrary, Myostatin inhibition leads to an expansion of the muscle progenitor pool and to muscle hypertrophy [19].

In pathological states of muscles, satellite cells are forced to make repeated rounds of division to form new muscle fibers or to regenerate necrotic parts of the pre-existing fibers. During lifetime, the absolute number of satellite cells decreases and these cells become unable to compensate for dystrophic damage. The muscle fibers are gradually lost and replaced by connective and adipose tissue [20, 21]. The exhaustion of regenerative capacity in dystrophic muscles is, till now, not fully understood and may differ in different types of MD. The most frequent MD are the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) and a milder variant of DMD, the Becker Muscular Dystrophy (BMD). This latter is a X-linked muscular disorder occurring mainly in boys, with frequency 1 : 3500 male live births [22, 23] and leading to premature death. BMD is caused by the absence of dystrophin protein, the crucial component of the macromolecular Dystrophin Glycoprotein Complex (DGC), complex linking the actin-associated cytoskeleton of muscle fiber to the basal lamina. The lack of dystrophin compromises this link and leads to muscle fiber degeneration [24]. The loss of the linkage between the extracellular matrix and the actin cytoskeleton is also at the origin of limb-girdle muscular dystrophies (LGMDs). LGMDs form a clinically and genetically hetero-

geneous group of inherited muscular dystrophies [25]. Some are caused by dysfunction of sarcoglycan complex and by aberrant glycosylation of α -dystroglycan (LGMD2C, D, E, F, I) [26]. Other are caused by mutations of *dysferlin* encoding plasma membrane protein (LGMD2B), *calpain 3* involved in myofibrillar proteins degradation (LGMD2A), or *calveolin-3* encoding a membrane component implicated in cell signalling (LGMD1C) [27- 29]. To the group of muscle diseases characterised by muscle wasting and defects in muscle regeneration belong also myotonic dystrophy type 1 and 2 (DM1 and DM2). DM are caused by an expansion of CTG (DM1) or CCTG (DM2) motifs in non-coding portions of genes [30, 31]. The expanded repeats lead to the formation of nuclear inclusions and to protein sequestration such as transcription factors and splicing factors. Consequently, splice control is disrupted in muscle cells and leads to the production of abnormal isoforms of a set of sarcomere components [32]. Expansion of another triplet GCG, is characteristic of oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD). Expanded GCG repeats occur in the first exon and affect the function of the PABPN1 gene involved in transcripts maturation. The morphological hallmark of this disease is a unique intranuclear tubulofilament inclusion in skeletal muscle fibers. This disease is characterised by eyelid drooping (ptosis), swallowing difficulties (dysphagia) and proximal limb weakness [33]. Finally, the third most common muscular dystrophy called FSHD (facioscapulohumeral muscular dystrophy) results from a loss of a critical number of repetitive elements known as D4Z4 in the 4q35 subtelomeric region. The consequence of partial deletion of D4Z4 elements is chromatin alteration and the loss of appropriate control of gene expression [34, 35].

In all MD cases discussed above, the capacity of satellite cells to proliferate and undergo differentiation is compromised, affecting the efficiency of muscle regeneration. One compelling argument for the reduced satellite cells proliferation is a mechanism involving replicative aging. Olovnikov suggested that the cause of cellular senescence was the gradual loss of telomeric DNA at each cell division. It is generally accepted that once the telomere length becomes too short, the signal of DNA breakage is generated [36]. Short telomeres have been observed in DMD and LGMD2C when telomere loss is 14 times greater than that observed in controls [37]. This observation confirms that the decline in regenerative capacity is due to the premature senescence of satellite cells induced by their excessive proliferation during muscle repair. Other reports [38] suggest that the impaired myogenesis observed in DMD results from defective myoblast fusion. Delayed myoblast fusion and abnormal differentiation could be caused by TGF γ -1 released from DMD myoblasts and known as the critical factor in initiating muscle fibrosis in DMD muscles [39]. Contrary to DMD satellite cells, the DM1 satellite cells lose prematurely their regenerative capacity via a mechanism involving p16, which appears independent from telomere shortening [40].

Dystrophic muscles degeneration may be also caused by a decreased level of neuronal-type nitric oxide synthase (nNOS). nNOS plays an important role in skeletal muscles, by producing high levels of nitric oxide (NO) - a small, freely diffusible, ubiquitous molecule which binds free radicals and is required for normal vascular hypertrophy [41]. Synthesis of NO in active muscles opposes contractile force [42]. It was found that NO was an early step in satellite cell activation and myoblast fusion [41,43,44]. In intact muscles, nNOS is associated in sarcolemma with DGC. In the absence of dystrophin in DMD muscles, nNOS is mislocalised from plasmalemma to the cytoplasm where it is less stable and therefore rapidly degraded. Aberrant translocation of nNOS from sarcolemma to cytosol in DMD has implications for the pathogenesis of muscular dystrophy [45, 46].

In effective regeneration of muscles, several growth factors have been shown to play key roles. Prominent among these is the insulin-like growth factor 1 (IGF-1). *In vitro* studies have demon-

strated the ability of IGF-1 to promote satellite cells proliferation, differentiation and fusion [47]. The important role of IGF-1 in skeletal muscle regeneration has been demonstrated in transgenic mice, where overexpression of IGF-1 increases regeneration.

ANIMAL MODELS OF HUMAN MUSCULAR DISEASES AND MUSCLE REGENERATION

Animal models are commonly used to gain insights into genetic control of mechanisms underlying human muscular disorders, in order to design and test therapeutic strategies. It is largely accepted that by using mammalian models for dissecting a human disease, one can accelerate identification of pathways involved in pathogenesis and uncover targets for treatment. During the last decade, accumulating evidence for high conservation of mechanisms that control muscle development and muscle repair has led to generation of a number of invertebrate models of human muscular diseases [48-53]. Here, through three examples of human muscular disorders, we describe the importance of invertebrate models *versus* mammalian models.

Animal models of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)

DMD is caused by well-characterized point mutations in the *dystrophin* (*dys*) gene making gene therapy a strategy of choice for treatment. The absence of Dys destabilizes the DGC components and results in membrane fragility and disruption during contraction. Besides its mechanical role, Dys is involved in signalling cascades *via* DGC proteins partners, Dystrobrevin and Syntrophin, as well as in the aggregation of ion channels in the membrane. Its absence may lead to abnormal channel function [54].

Several gene therapy approaches that aim at replacing the mutated *dys* allele or at correcting its defective transcripts have been applied on the mammalian DMD models. The *mdx* mice models with point mutations in the *dys* gene were used, for instance, to test recombinant adeno-associated vectors encoding a *microdystrophin* gene [55]. When administered by systemic injection, these vectors were able to efficiently improve the level of Dys in diseased muscle and reduce muscle fiber degeneration in mice with advanced-stage dystrophy. In contrast to mice, in DMD developing *cxmd* dogs, the viral vectors are progressively eliminated by the immune system, reducing the efficiency of gene therapy. For this reason, finding a treatment that would modulate the immune system and allow a long-term *microdystrophin* expression appears as an important step in improving viral vectors [56]. The *mdx* mice were also used to correct the mutated *dys* RNA by exon skipping [57]. Recently, the viral gene transfer vector has been adapted for the delivery of antisense sequences and their efficiency has been demonstrated in the context of DMD. Therapeutic exon-skipping was obtained in the skeletal muscle of mice and dogs affected with the disease and in cells from human patients, when the appropriate antisense sequences were linked to a modified U7 small nuclear RNA (snRNA), which was itself expressed from adeno-associated or lentiviral vectors [58].

Prior to these trials, a nematode model of the DMD was generated and applied to screen a library of compounds. Some of which were found out to rescue partially the muscle degeneration phenotype [59, 60]. Recently, *Drosophila dys* and *dystroglycan* (*dg*) mutants were used to identify new regulators of the Dg-Dys complex and their potential role in DMD pathogenesis [61]. A genetic interaction screen to identify modifiers of *dg* and *dys* mutant phenotypes has been performed revealing that the Dg-Dys complex interacts with components of Notch, TGF- β and EGFR signalling pathways. Interestingly, components of pathways that are required for cellular and/or axonal migration through cytoskeletal regulation, such as Semaphorin-Plexin, Frazzled-Netrin and Slit-Robo pathways also interact with Dys and/or Dg. These findings highlight the capacity of Dys to transmit information from the extracellular matrix to the cytoskeleton inside the cell and open new

research directions to identify therapeutic targets involved in this process.

In addition to skeletal muscle degeneration, DMD patients show severe cardiac dysfunction and morphological alterations, which remain poorly understood. Recent results indicate the utility of *Drosophila* as a model system to study DMD associated cardiac defects and in particular the dilated cardiomyopathy [51]. The simple structure and physiology of the *Drosophila* heart tube together with the available genetic tools provide a suitable *in vivo* assay system for studying cardiac gene functions. The *Drosophila dys* mutants display an age-dependent disruption of the myofibrillar organization within the myocardium as well as alterations in cardiac performance, highly reminiscent of cardiac defects observed in DMD patients. RNAi-mediated knockdown of *dys* in *Drosophila* also shortens lifespan, increases the heart rate and causes a widening of the cardiac tube, a phenotype resembling dilated cardiomyopathy and reversible by targeted expression of a truncated mammalian form of *dys* [51].

Animal models of muscle dystrophies caused by RNA or protein toxicity

Animal models are of particular importance for dissecting molecular bases of muscle diseases caused by the toxicity of RNA (Myotonic Dystrophy) or by protein sequestration (Oculopharyngeal Muscular Dystrophy). To better understand these highly complex multi-systemic diseases, both the mammalian and the easy to handle, short-lived invertebrate models have been generated and are used to identify genetic or chemical modifiers of the RNA or protein toxicity.

DM1 animal models

To mimic pathological influence of CTG repeats present in DM1 patients in non-coding region of the *dmpk* gene, an expression cassette containing 250 copies of CTG has been inserted into the mouse genome. The transgenic mice with high expression level of CTG repeats exhibit muscle defects reminiscent to those observed in DM1 patients, such as myotonia and short-sized muscle fibers with central nuclei [62]. Thus, mouse model appears well suited to test functions of genes involved in DM1 pathogenesis. This has been already applied to reverse myotonia by overexpressing *Muscleblind like 1 (MBNL1)* gene in muscle cells [63] or by correcting aberrantly spliced RNA of *CIC-1* gene [64, 65]. However, to date, the strategies carried out on mouse model do not take into account the multi-systemic feature of the DM1 pathology.

The *Drosophila* DM1 model has been generated by targeting expression of 480 CTG repeats into developing muscle cells and differentiated muscle fibers. The RNA carrying repeated CUG motifs accumulated in nuclei of muscle cells forming nuclear foci and leading to the sequestration of muscleblind (Mbl) protein, the *Drosophila* orthologue of MBNL1 [66]. Importantly, the transgenic flies exhibited an age-dependant flight muscle degeneration [66] resembling that observed in DM1 patients. Based on these phenotypes, a genetic and chemical compounds screen was performed using *Drosophila* model. This screen lead to the identification of 10 genetic and 10 chemical modifiers able to revert CUG repeat toxicity [67]. In a similar manner, the *C. elegans* transgenic strains expressing CUG repeats were found to display muscle coordination troubles and an age-dependant muscle structure impairment [68]. The worm DM1 model might also be used for testing drugs that could revert repeat toxicity.

OPMD animal models

The OPMD associated muscle defects caused by the toxicity of GCG repeats translated into a polyalanine tract have been reproduced in mouse, *C. elegans* and *Drosophila*. Nuclear inclusions of the polyalanin tract detected in pharyngeal muscles of OPMD patients are also observed in mouse model of the disease [69]. In consequence, the OPMD mice exhibit muscle weakness, affected

coordination and peripheral nerves impairment [70], phenotypes that can be partially reverted by the administration of the chaperone trehalose [71] or doxycycline [72].

The OPMD nematode model exhibits muscle cell degeneration and abnormal motility and it has been applied to screen for genes able to rescue these phenotypes [73]. Among others, three genes involved in modulating histone deacetylase were found to restore the motility [73]. Moreover the *Drosophila* OPMD model has been used to reduce nuclear inclusions of PABPN1 protein and in consequence to stop OPMD progression. The overexpression of several chaperones resulted in rescue of the phenotype by folding properly the mutated PABPN1 protein [49]. In addition, this model was used to test *in vivo* the efficiency of intrabodies against PABPN1 (cellular llama heavy-chain antibody), which were shown *in vitro* to prevent disease progression [74] by splitting nuclear inclusions and reducing their size.

Taken together, all described above invertebrate models are particularly well suited for global genomic and transcriptomic approaches dedicated to identify networks of genes with affected function and to apply genetic rescue strategies to test potential candidates for gene therapy.

MUSCLE REGENERATION IN AGING MUSCLE

Regenerative potential of skeletal muscles declines with age and occurs naturally and progressively during normal lifetime. The age-related loss of muscle mass called sarcopenia results in a decline in muscle fiber number and a decrease in fiber size. Sarcopenia is attributable to an imbalance between protein synthesis and degradation or between apoptosis and regeneration processes [75, 76]. Muscle tissue loses regenerative potential mainly due to age-related changes in satellite cells activity [77]. With age, satellite cells become less effective, partly because of the diminished activation of Notch signalling. Under normal conditions, in skeletal muscles, the Notch signalling pathway contributes to muscle development, as well as activation, proliferation and differentiation of satellite cells during postnatal myogenesis. Inhibition of the Notch signalling efficiency inhibits cell cycle progression and G1-S phase transition causing ineffective regeneration [78]. It has been demonstrated that injured muscles of aging mice are defective in Notch signalling, because they are unable to upregulate Delta, the extracellular Notch ligand. When the Notch signalling pathway is not activated, the satellite cells do not generate sufficient progeny for effective regeneration. In contrast, activation of Notch signalling *in vivo* markedly improves the regeneration of old muscle, rendering it similar to young muscle [78]. It has also been shown *in vitro* that the exposure of satellite cells from old mice to serum from young mice enhances the expression of the Notch ligand (Delta) and proliferation [79]. These studies suggest that the age-related impairment of muscle may not be due to decline of progenitor cells activity but rather to age-related alterations in production of inductive signals.

Loss of proliferative capacity of satellite cells with age, similar to that observed in DMD, may be also due to excessive telomeric DNA shortening which occurs on each cell division. It has been shown in human satellite cells *in vitro*, that there is a regular loss of 113 bp of DNA at each cell division [80]. Decary *et al.*, have demonstrated that proliferative capacity and telomere length of satellite cells both decrease with age during the first two decades [37]. However the myonuclei of human skeletal muscle are remarkably stable because the telomere length in these nuclei remains constant in adult muscle. Telomere length seems to shorten in a variety of organisms with advanced age, although it is poorly understood how this process is regulated.

It has also been proposed that myogenic regulatory factors (MRFs), which belong to the family of basic helix-loop-helix proteins (bHLH), play an important role in aged muscles [81]. The

main role of MRFs during postnatal growth of muscles is satellite cells activation and differentiation [82]. In rat skeletal muscles, MRF protein levels have been reported to be reduced during aging even in the presence of elevated mRNA levels [83]. Delayed and reduced expression of MyoD, Myf-5 and Myogenin was also observed in aged human muscles [84]. Musaro *et al.*, reported that MyoD and Myogenin transcripts were expressed at high level in the muscles of newborn mice and that their level of expression continuously declined through postnatal life to become virtually undetectable in adults [85]. However, these transcripts are again expressed at high levels in the muscle of older mice. On the other hand, MRF4 transcripts are present at a constant level throughout animal lifetime. These results suggest that the impaired regenerative potential of aged skeletal muscles may be associated with aberrations in the transcriptional hierarchy required for myogenesis due to changes in the MRF co-regulators. Id proteins (inhibitors of DNA binding/differentiation) are negative regulators of bHLH type transcription factors, including MRF proteins [86]. In aged rat muscles, an increased expression of Id-1, Id-2 and Id-3 was observed [81]. Although Id proteins stimulate satellite cells proliferation, their increased expression may also inhibit these cells differentiation [86]. It was found that Id proteins could cause atrophy by impairing activity of MRFs [87]. Besides hampering the activity of MRFs, increased level of Id transcripts during muscle aging can also induce apoptosis [83].

In comparison to dystrophic muscles, multiple lines of evidence suggest that many intracellular changes occur with age, including the accumulation of oxidative damage to proteins, lipid, DNA and diminished mitochondrial function called “mitochondrial theory of aging” [88]. Central to this is an increase in oxidative stress, mediated by an increased production of reactive oxygen species (ROS), and/or a reduced antioxidant capacity. Higher levels of lipid peroxidation have been demonstrated in human skeletal muscle of older individuals when compared to younger individuals. This complex situation is observed not only in aged muscle but also in resident satellite cells [89]. In satellite cells, antioxidant activity of catalase and glutathione transferase is drastically reduced in aged muscles compared to that in cells isolated from young individuals [90]. In addition, increased oxidative stress leads to the accumulation of damaged proteins, which are not properly eliminated, aggregate, and in turn impair proteolytic activities [76]. In support of the “mitochondrial theory of aging”, a progressive relationship has been established between age and the accumulation of mtDNA deletions and mutations. Changes in muscle mitochondrial function mainly include decreased mtDNA copy and mRNA concentrations in gene encoding mitochondrial proteins and reduced muscle mitochondrial oxidative enzymes and protein synthesis [91]. It was demonstrated that mouse models that harbour elevated mtDNA mutation frequencies age prematurely [92]. Accumulation of mtDNA mutations also promotes apoptosis and may be a central mechanism in sarcopenia [93].

The age-related muscle wasting results also in decreased circulating levels of several anabolic hormones such as IGF-1 [84]. It was observed that circulating IGF-1 levels were lower in older individuals than in young ones [94]. A decrease in IGF-1 signalling may play an important role in motor neurons reduction or loss [95]. IGF-1 has a positive effect on neurons, including myelination, prevention of apoptotic death, stimulation of axonal sprouting and repair of damaged axons [96,97]. It was revealed, that IGF-1 overexpression in skeletal muscle of aging mice prevents deleterious effects of age in skeletal muscles and in the neuromuscular system [98]. Muscle IGF-1 overexpression prevents external Ca^{2+} -dependent contraction, suggesting that age-related denervation contributes to dependence of aged muscle fibers on external Ca^{2+} ions to maintain tetanic force. Targeting IGF-1 to spinal cord motor neurons prevents both external Ca^{2+} -dependent contraction and denervation of muscle fibers. Inducing overexpression of IGF-1 in

muscle also prevents excitation-contraction (EC) uncoupling and maintains skeletal muscle fiber force in aged mice [99].

The biochemical, physiological, morphological and molecular parameters that contribute to muscle aging and MD seem to share similar features. Multiple types of studies reveal that the gradual loss of regenerative and functional capacities of muscles during age-related sarcopenia and in MD are largely attributable to similar extrinsic and intrinsic factors affecting muscles. However, the main cause is a decline in the number of satellite cells and/or in their inability to activate and differentiate. Shefer *et al.*, found that although the number of satellite cells was decreased in aged muscle, their intrinsic myogenic potential and self-renewal potential remained unchanged [100]. This was also confirmed by grafting experiments: old grafted cells in young host displayed robust activation, whereas young satellite cells in old host were less performant in regeneration [101, 102]. These studies strongly suggest that the poor regenerative potential of muscles in old animals does not depend on the satellite cells activity itself but mainly on the environment, which stimulates their activity. Detailed analyses demonstrate that satellite cells functions are regulated by signals from a ‘niche’ defined as the local microenvironment that influence satellite cells activity [6, 77]. The muscle myofiber is the most promising candidate for the satellite cells niche. Mechanical, electrical and chemical signals from muscle fiber have been shown to be involved in the regulation of satellite cells function but still little is known about molecular signals expressed or secreted by the myofiber that modulate satellite cells behaviour [77]. A growing body of evidence indicates that the basement membrane -a specialized sheet of connective tissue which covers satellite cells- is crucial in maintaining their position. It is also believed that the basement membrane plays an important role for maintaining the satellite cells quiescence [6,103]. Increased density of satellite cells has been observed, closely associated with capillaries and neuromuscular junctions, indicating that these structures also may secrete factors, which influence the satellite cells behaviour [104]. Therefore, identification of cellular and molecular components of satellite cells niche, which profoundly changes during muscle aging and in MD, appears as an important issue of future investigation. Better understanding of cellular and molecular mechanisms underlying satellite cell – niche interactions and more generally muscle regeneration processes in human diseased or aging muscle can be gained using animal models. In the next chapter, we provide arguments that the fruit fly *Drosophila melanogaster*, in which the conservation of myogenic pathway has been well documented, emerges as an attractive model system to gain insights into genetic determinants of muscle repair.

COMMON GENETIC PATHWAYS CONTROLLING MUSCLE DEVELOPMENT IN *DROSOPHILA* AND IN VERTEBRATES

The primordia of somatic mesoderm in *Drosophila* develop in response to a combined action of ectodermal signalling molecules and mesodermal transcription factors. During gastrulation, mesodermal cells invaginate along the ventral midline into the embryo, spreading as an epithelial sheet closely apposed to the external epidermis [105]. The adjoining ectoderm provides instructive signals for mesoderm development [106]. Products of patterning genes like *decapentaplegic (dpp)*, a *TGF- β* orthologue and *wingless (wg)*, a *Wnt* orthologue, are secreted from the epidermis and signal through the germ layers to pattern the mesoderm [107, 108]. Dpp signalling divides the mesoderm into dorsal and ventral (D/V) sectors by maintaining the expression of the NK homeobox gene *tinman (tin)* and repressing ventrally expressed genes such as *pox meso* [108]. An outcome of the activities of patterning genes is the refinement of Twist (Twi) expression from uniform levels to a modulated pattern in different mesoderm anlagen. These regulated differences in Twi expression

are crucial elements in assigning cells to different muscle types [109]. Mesodermal cells with the highest *Twi* level form a competence field for somatic muscles corresponding to vertebrate skeletal muscles. Subsequent Receptor Tyrosine Kinase (Htl, DER) action subdivides this territory into small clusters of equivalent cells (promuscular clusters, (Fig. (2)) from which the individual muscle progenitors segregate. This step involves a process of lateral inhibition (Fig. (2)) governed by neurogenic genes including Notch and its ligand Delta. Muscle progenitor cells are thought to divide asymmetrically and produce a pair of sibling cells: either the muscle founders or the precursors of adult muscles (AMP cells). Muscle founders fuse with surrounding fusion competent myoblasts (FCMs) to form syncytial fibers whereas AMPs, that share some features with vertebrate satellite cells, keep *twi* expression and stay undifferentiated during embryonic and larval life (Fig. (2)).

The evidence that in *Drosophila* embryos the mesoderm is subdivided into segmental units and that diversification of these units is influenced by TGF β , Wnt and Hh signals highlights the parallels between early mesoderm patterning in *Drosophila* and in vertebrates [69, 109-112]. For example, while in *Drosophila*, Wg signalling positively influences *twi* expression [113], in vertebrates, Wnts up-regulate MyoD [114].

Moreover, the function of *Twi* in *Drosophila* myogenesis appears reminiscent to that of the four closely related vertebrate MRF family genes encoding bHLH factors (MyoD, Myf5, MRF4

and Myogenin). Genetic analysis in mice indicate that Myf5, MyoD and MRF4 play partially redundant roles in muscle specification and that triple mutant makes no muscles [115], much like fly embryo with reduced levels of *Twi* [109]. From this perspective, analysing the genetic cascade downstream of *twi* in *Drosophila* appears an attractive way for identifying new components of myogenic pathway relevant for both invertebrate and vertebrate myogenesis.

Several lines of evidence indicate that a combinatorial code of transcription factors specifically expressed in different subsets of progenitors and founder cells is required to determine individual muscle fates. All larval muscles, which are single multinucleate fibers, are seeded by individual founder myoblasts (Fig. 2), displaying the expression of combination of transcription factors, such as *Kruppel*, *S59/slouch*, *apterous* and *ladybird* [116-123]. Later, their muscle identity is specified by the autonomous function of these transcription factors. As muscle identity genes are expressed in overlapping patterns in multiple founder cells, there seems to be a combinatorial code determining the identities of individual founder cell/ muscle fibers in a specific position. Even if founder myoblasts have not been identified in vertebrates, several conserved regulatory factors display expression patterns that are suggestive of early roles in generating myoblast diversity [124-126]. In the developing mouse limb, one specific subset of muscles is affected in mutants of *Lbx1*, an orthologue of *Drosophila* muscle

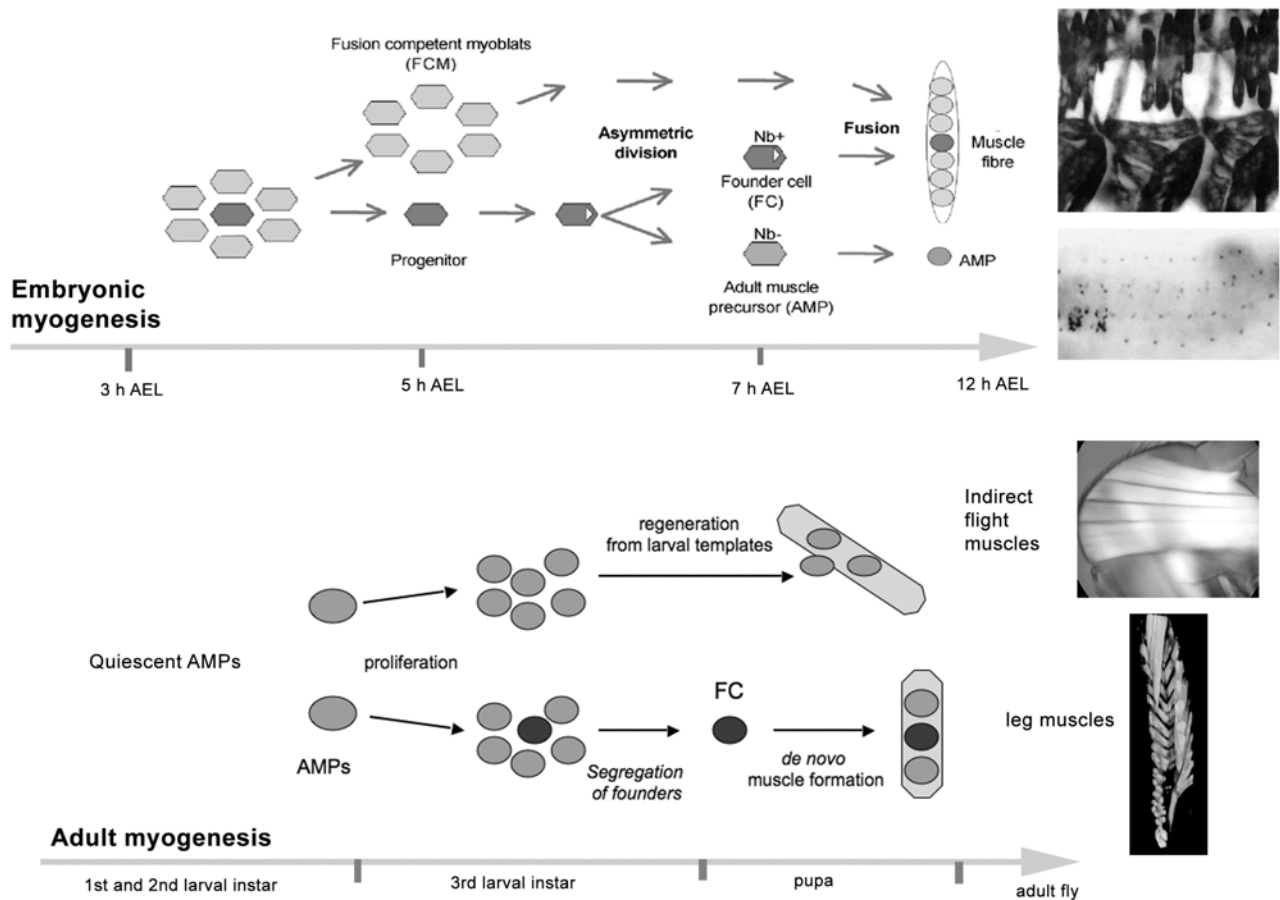


Fig. (2). Two waves of myogenesis in *Drosophila*. During embryonic life, muscle progenitors divide asymmetrically and give rise to muscle founder cells (FCs) and adult muscle precursors (AMPs). Founders fuse with fusion competent myoblasts (FCMs) and are at the origin of all larval body wall muscles. The AMPs stay non-differentiated and quiescent during embryonic and the majority of larval life. They represent a source of myogenic cells involved in adult myogenesis. They undergo proliferation during third larval instar and generate a pool of myoblasts from which segregate adult muscle founders. These latter cells are at the origin of newly formed adult muscles such as leg muscles. In parallel, a subset of AMPs get engaged in muscle regeneration, using persisting larval templates to form the Indirect Flight Muscles in the thorax.

identity gene *ladybird* [127,128], whereas, a different subset of limb muscles is affected in *Mox2* mutants [129]. It was shown in *Drosophila* that the diversification of flight muscles requires the intrinsic action of the Vestigial transcription factor [130]. Interestingly, mouse and chick homologues of Vestigial, the Vito/Vgl are expressed in a subset of appendicular muscle precursors [131] suggesting that they might also play a role in setting muscle diversity. Thus, one can speculate that in vertebrates too, a combinatorial code of transcription factor activity is used in generating muscle diversity.

An important aspect of myogenic differentiation is the generation of multinucleate muscle fibers through the fusion of myoblasts. Fusion starts with cell attraction, followed by adhesion, alignment and finally membrane breakdown and fusion itself. The basic cell biology of myoblast fusion is similar in *Drosophila* and vertebrates [132]. In *Drosophila*, a founder cell (FC) fuses with the neighbouring FCs. The recognition is specific, directional [118] and determined by the asymmetrical distribution of molecules in the FC and the FCs. For example, Dumbfounded (Duf) is expressed in FCs only whereas Stick and Stones (Sns) is specific to FCs. Sns localizes to the plasma membrane prior to the fusion, and is thought to act as receptor for Duf. Interestingly, Sns shares homology with human Neph1 [133] and *C. elegans* SYG1, whereas Duf is homologous to human Neph1 and *C. elegans* SYG2. It has been shown that Neph1 interacts with Neph1 in the kidney [134] and SYG-1 is able to bind SYG-2 in *C. elegans* [135, 136]. Conservation of genetic cascade governing myoblast fusion is supported by recent functional analyses of the Duf homologue in zebrafish, called Kirrel [137] and Sns homologue Neph1 in zebrafish and mice [138]. Kirrel localizes to the membrane of myoblast precursors of the fast-twitch lineage and is essential for their fusion and the formation of syncytial myotubes. In a similar manner, Neph1, a key molecule required for kidney development, is also expressed in growing muscles and plays crucial role in myoblast fusion in both zebrafish and mice.

In *Drosophila*, among other genes implicated in the fusion process is *myoblast city* (*mbc*). The *mbc* locus encodes a cytoplasmic protein containing an SH3 domain with extensive homology to the human Dock180 proteins [139-141]. Various data suggest that Mbc is recruited by Duf to discrete points on the membrane in order to induce cell shape changes and membrane changes of the fusing cells. The recent analyses in zebrafish [142] and mouse [143] show that fusion of embryonic fast-twitch myoblasts requires the activities of Dock180 and the closely related Dock5 protein, further supporting the notion that myoblast fusion follows a defined sequence of events that are similar in vertebrates and invertebrates. Following the earliest fusion events, the developing myotubes extend growth cone-like filopodia to seek out and contact epidermal muscle attachment sites also called tendon cells (TCs) [144, 145]. Genetic analyses have demonstrated that the differentiation of TCs is biphasic; the first phase is muscle independent and the second phase is triggered by interaction with growing myotubes. The initial positioning of TC cells at the parasegment boundaries is achieved through activation of the *stripe* (*sr*) gene, encoding an Early Growth Response EGR-like nuclear protein. Interestingly, *sr* mutant embryos exhibit an aberrant somatic muscle pattern, in which the myotubes send filopodia in incorrect directions [146] whereas ectopic expression of *sr* in other epidermal cells causes them to differentiate as additional tendon cells [147, 148]. The final muscle-dependent differentiation of TCs requires the *Drosophila* EGF receptor DER and the Neuregulin homolog Vein activating DER in TCs [149]. The developing myotube guided both by intrinsic signals and guidance cues from specific TCs grows and forms correct connections with a specific attachment site [150]. For example, a transmembrane protein, Kon-tiki (Kon) [151], expressed in a specific subset of myotubes was

found to be required autonomously for these myotubes to recognize their TC targets and to establish stable connections.

In vertebrates, muscles attach to bones through tendons. To date, little is known about mechanisms that control this late aspect of vertebrate myogenesis. The most important data come from studies in chick embryos where it has been found that, as in *Drosophila*, the first step of TC development is cell autonomous whereas the final tendon differentiation requires interactions with the muscle [152]. Recent observations also indicate that the vertebrate orthologues of *sr*, the *Krox20* and *Krox24* genes, are specifically expressed in developing tendons (D. Duprez, personal communication), suggesting that they play conserved roles in TC development.

ADULT MUSCLE PRECURSORS (AMPs), THE *DROSOPHILA* MUSCLE STEM LIKE CELLS REQUIRED FOR ADULT MUSCLE FORMATION AND REGENERATION

AMPs are produced as sister cells of muscle FCs after the division of muscle progenitors [153]. Asymmetric segregation of Numb during division of progenitor cells (Fig. (2)) results in the production of two sister cells with different identities. The daughter cell that inherits Numb, and therefore prevents the Notch pathway from functioning, is committed to become an FC and assembles an embryonic muscle. Its sister, which does not inherit Numb, and which has Notch signalling active, continues to express Twi and postpones differentiation as an AMP cell. Twi expression in AMPs is positively regulated by Notch signalling [154] and it was found that differentiation of muscles requires a decline in Twi levels as observed in flight muscles [154]. Interestingly, during mouse myogenesis, Twi is observed in non-differentiated muscle progenitors, all over the epithelial somites [155], and then excluded from the myotome upon initiation of skeletal myogenesis. In both *Drosophila* and vertebrates, the bulk of adult muscles is produced from the muscle precursor cells, either through the formation of new fibers or by fusion with existing muscle fibers. The main difference between embryonic and adult *Drosophila* muscles is that the latter are multi-fiber as in vertebrates. From this perspective, understanding mechanisms governing adult *Drosophila* myogenesis is of particular interest. Two different mechanisms are employed by the fly to generate the adult muscle pattern. In the first one, persistent larval muscles act as scaffolds to which adult myoblasts fuse to form the adult muscles. An example of this mechanism occurs in the formation of a subset of flight muscles, the Dorsal Longitudinal Muscles (DLMs), and is reminiscent of the formation of secondary fibers on the primary fiber scaffold in vertebrates. The second mechanism is *de novo* muscle formation, by myoblasts fusion. This mechanism concerns other flight muscles (dorsoventral muscles (DVMs), direct flight muscles (DFMs)), leg muscles and the abdominal muscles [156-158]. As in the embryo, adult fly muscles are also made using the founder mechanism [159, 160]. The key feature of FC is that they can form small muscles in the absence of fusion [161]. Adult FCs are clonally derived from siblings of embryonic FCs. Recently, it was shown that the maturation of adult FCs in the abdomen of the fly is mediated by signalling through the Fibroblast Growth Factor receptor, Heartless (Htl) [160]. In the muscles of the adult abdomen, it was shown that the developmental patterns of Heartbroken/Dof and Sprouty result in defining the domain and timing of activation of Htl in specific myoblasts, thereby converting them into FCs. In vertebrates, myoblasts aggregate and fuse to form primary muscle fibers but it is still an open question whether they are also patterned by the induction of founders at the sites of muscle formation.

Particular interest for *Drosophila* AMPs results from the fact they can be compared to vertebrate muscle stem cells also called satellite cells [162]. The following observations are in support of this notion. Like satellite cells, the AMPs are associated with

muscle fibers. They are located close to embryonic muscles, which do not histolyze, and are likely to control AMP proliferation and/or differentiation. The specification of *Drosophila* AMPs via asymmetric Numb segregation is reminiscent of the process of satellite cell renewal in vertebrates. Like satellite cells, AMPs are quiescent during embryonic and early larval life and become activated by environmental factors [163]. The AMPs are not committed to a particular muscle lineage and the type of muscles they give rise to depends on growth factors and signals provided by surrounding tissue [164, 165]. Another interesting feature of *Drosophila* AMPs is their migration to form physiologically different types of muscles. In *Drosophila* thorax, AMPs associated with the imaginal discs migrate to specific positions near the epidermis [156], while in vertebrates, subpopulations of progenitor cells undergo long range migration to form muscle masses in the limb, diaphragm and tongue.

To gain further insights into conserved aspects of muscle stem cell biology, we have recently applied a large-scale genetic screen in *Drosophila* to identify genes involved in AMPs specification and found that *rhomboid* and other EGF pathway components play a crucial role in this process [166], (Figeac *et al.*, submitted). We identified new AMP cell markers, E(spl)M6 and Him, corresponding to targets of Notch signalling and indicating that Notch signals are key evolutionarily conserved inputs, involved in muscle cell stemness. Also, by targeting GFP to AMP cell membranes we found that non-differentiated muscle cells send long cellular processes and are interconnected (Figeac *et al.*, submitted). A key role of EGFR signalling is supported by the identification of

functional EGF effector (ETS) binding sites within the *ladybird* regulatory modules that drive expression in lateral AMPs. (Fig. (3)). Interestingly, the main difference between regulatory modules driving expression in differentiated muscle lineages *versus* regulatory modules that act in non-differentiated AMPs is the responsiveness of the latter to extrinsic EGF signals. Thus, the genetic evidence and the analyses of regulatory modules operating in AMPs allow us to propose that non-differentiated state of muscle cells is not an intrinsic property but that it depends on signals emitted from the neighboring cells.

To further investigate the potential role of EGFR signalling in AMP cell survival, we focused on lateral region and attempted to identify EGF sending cells. Our data indicate that in each hemisegment, one lateral mesodermal cell and several epidermal cells, express high levels of *rho* and are thus expected to secrete the EGF ligand *spitz*. Consistent with these findings, and the concomitant accumulation of phospho-ERK in AMPs, the overexpression of *rho* in specified muscle founders or in ectodermal cells lead to an increased number of AMPs, similar to that found in embryos deficient for apoptosis. Taken together, these data demonstrate that EGFR signalling plays an active role in AMP cell specification and, in later stages, protects them against apoptosis (Fig. (3)). The maintenance of a correct number of AMPs depends on a local EGF signal secreted collectively by the neighboring founders and by the overlying epidermal cells, which behave as AMP cell niche.

Intriguingly, the role of EGF signals in satellite cells survival [167] and specific expression of *lb* orthologue, *Lbx1* gene, in

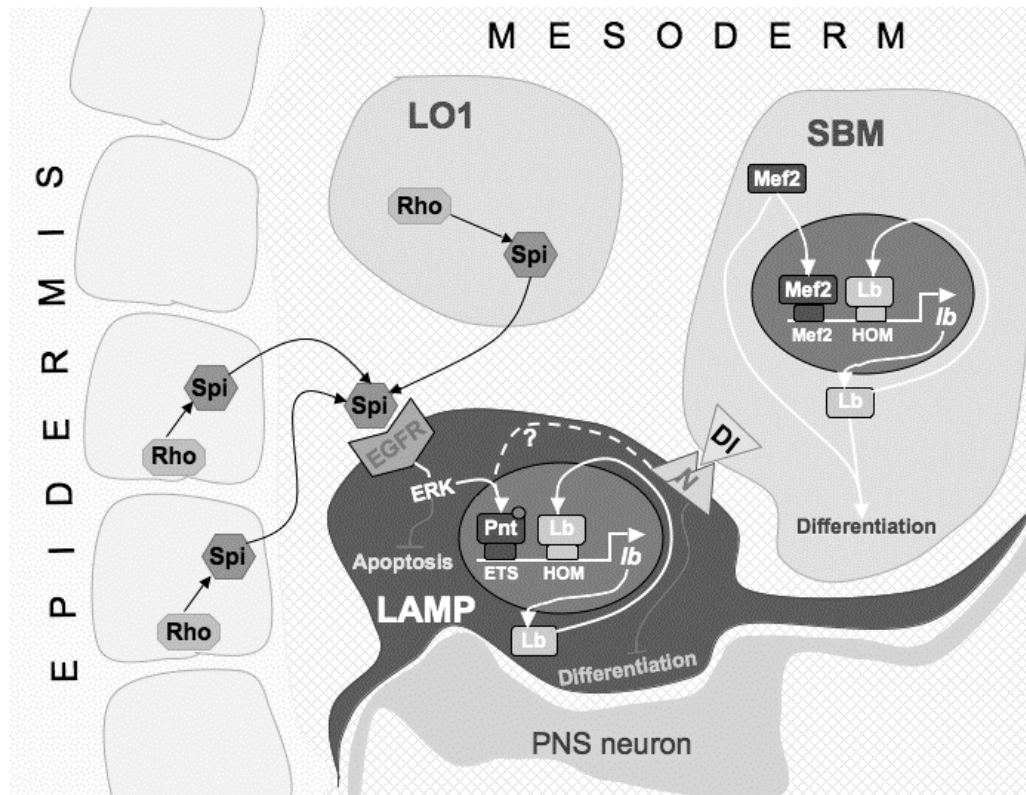


Fig. (3). A scheme illustrating regulatory modules and regulatory inputs operating in AMPs and in differentiated muscle in *Drosophila*. Laterally located muscle stem cell (LAMP) requires EGFR pathway for its specification maintenance (by blocking apoptosis). The activity of LAMP-specific regulatory module depends on extrinsic EGF signals emitted by the mesodermal LO1 founder and the neighbouring epidermal cells. This suggests that the acquisition of a non-differentiated state of LAMP is cell non-autonomous. LAMP displays also specific activity of Notch pathway, most probably activated *via* Delta signal emitted by the SBM precursor. The AMPs send also cellular processes along the nerves suggesting they may interact. In contrast regulatory element operating in differentiated SBM muscle lineage appears independent of extrinsic influence. It is positively regulated by intrinsic Mef2 and maintained active *via* *ladybird* auto-regulatory feedback loop. This results in activation of *ladybird* and Mef2 targets leading to the myogenic differentiation and a fiber-type specific acquisition of muscle identity.

activated satellite cells [168] suggest that similarities in genetic control of *Drosophila* and vertebrate muscle stem cells may extend beyond those discussed here.

CONCLUSIONS

The presented here view on pathways controlling muscle development and regeneration reveals high complexity of cellular and molecular events underlying these processes in normal and, in particular, in pathological conditions. One attractive way to accelerate studies and to identify adapted treatments that improve muscle regeneration in aging or in diseased muscle is applying simple animal models such as *Drosophila*. High throughput genetic and/or chemical compound screens can be easily designed and performed in invertebrate models. Few examples of such a successful strategy are described in this review. Moreover, the similarities that exist in myogenic pathway governing formation and maintenance of skeletal muscle in vertebrates and in *Drosophila* provide researchers with powerful tools enabling to test rapidly candidate genes functions and their potential to rescue mutant phenotypes. In this respect, generation of *Drosophila* models of human muscular diseases is of high importance and proved already efficient in providing cues into genetic pathways affected in MD and in identifying potential targets for gene therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to the Association Française contre les Myopathies, the Association pour la Recherche sur le Cancer, and to the MYORES Network of Excellence (Grant LSHG-CT2004-511978) for the support.

ABBREVIATIONS

AMP	=	Adult Muscle Precursor
BMD	=	Backer Muscular Dystrophy
DFM	=	Direct Flight Muscle
Dg	=	Dystroglycan
DGC	=	Dystrophin Glycoprotein Complex
DLM	=	Dorsal Longitudinal Muscles
DM	=	Myotonic Dystrophy
DMD	=	Duchenne Muscular Dystrophy
dpp	=	Decapentaplegic
Duf	=	Dumbfounded
DVM	=	Dorso Ventral Muscles
Dys	=	Dystrophin
FC	=	Founder Cell
FCM	=	Fusion Competent Myoblast
FGF	=	Fibroblast Growth Factor
Htl	=	Heartless
IGF-1	=	Insulin-like Growth Factor 1
Kon	=	Kon-tiki
LGMD	=	Limb-Girdle Muscular Dystrophy
mbc	=	Myoblast city
Mbl	=	Muscleblind
MBNL1	=	Muscleblind-like 1
MD	=	Muscular Dystrophy
nNOS	=	Neuronal-type Nitric Oxide Synthase
OPMD	=	Oculo Pharyngeal Muscular Dystropy
Sns	=	Stick and Stones
sr	=	stripe
TC	=	Tendon Cell

Tin	=	Tinman
Twl	=	Twist
wg	=	wingless

REFERENCES

- [1] Yablonka-Reuveni Z, Anderson Je. Satellite cells from dystrophic (mdx) mice display accelerated differentiation in primary cultures and in isolated myofibers. *Dev Dyn* 2006; 235: 203-12.
- [2] Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 2005; 435: 948-53.
- [3] Seale P, Asakura A, Rudnicki Ma. The potential of muscle stem cells. *Dev Cell* 2001; 1: 333-42.
- [4] Seale P, Rudnicki Ma. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 2000; 218: 115-24.
- [5] Conboy Im, Rando Ta. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell* 2002; 3: 397-409.
- [6] Kuang S, Gillespie Ma, Rudnicki Ma. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 22-31.
- [7] Collins Ca, Olsen I, Zammit Ps, Heslop L, Petrie A, Partridge Ta, *et al.* Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 2005; 122: 289-301.
- [8] Collins Ca, Partridge Ta. Self-renewal of the adult skeletal muscle satellite cell. *Cell Cycle* 2005; 4: 1338-41.
- [9] Kuang S, Charge Sb, Seale P, Huh M, Rudnicki Ma. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol* 2006; 172: 103-13.
- [10] Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, *et al.* Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol* 2006; 172: 91-102.
- [11] Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki Ma. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* 2007; 129: 999-1010.
- [12] Mckinnell Iw, Ishibashi J, Le Grand F, Punch Vg, Addicks Gc, Greenblatt Jf, *et al.* Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 77-84.
- [13] Vasyutina E, Lenhard Dc, Wende H, Erdmann B, Epstein Ja, Birchmeier C. RBP-J (Rbpsi) is essential to maintain muscle progenitor cells and to generate satellite cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 4443-8.
- [14] Schuster-Gossler K, Cordes R, Gossler A. Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in Delta1 mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 537-42.
- [15] Arias Am, Hayward P. Filtering transcriptional noise during development: concepts and mechanisms. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 34-44.
- [16] Hayward P, Kalmar T, Arias Am. Wnt/Notch signalling and information processing during development. *Development* 2008; 135: 411-24.
- [17] Brack As, Conboy Im, Conboy Mj, Shen J, Rando Ta. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 50-9.
- [18] Lagha M, Kormish Jd, Rocancourt D, Manceau M, Epstein Ja, Zaret Ks, *et al.* Pax3 regulation of FGF signaling affects the progression of embryonic progenitor cells into the myogenic program. *Genes Dev* 2008; 22: 1828-37.
- [19] Manceau M, Gros J, Savage K, Thome V, Mcpherron A, Paterson B, *et al.* Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors. *Genes Dev* 2008; 22: 668-81.
- [20] Webster C, Blau Hm. Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somat Cell Mol Genet* 1990; 16: 557-65.

- [21] Heslop L, Morgan Je, Partridge Ta. Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 12): 2299-308.
- [22] Emery Ae. Clinical and molecular studies in Duchenne muscular dystrophy. *Prog Clin Biol Res* 1989; 306: 15-28.
- [23] Batchelor Cl, Winder Sj. Sparks, signals and shock absorbers: how dystrophin loss causes muscular dystrophy. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 198-205.
- [24] Nishino I, Ozawa E. Muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 2002; 15: 539-44.
- [25] Wagner Kr. Genetic diseases of muscle. *Neurol Clin* 2002; 20: 645-78.
- [26] Angelini C, Fanin M, Freda Mp, Duggan Dj, Siciliano G, Hoffman Ep. The clinical spectrum of sarcoglycanopathies. *Neurology* 1999; 52: 176-9.
- [27] Piccolo F, Moore Sa, Ford Gc, Campbell Kp. Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies. *Ann Neurol* 2000; 48: 902-12.
- [28] Richard I, Roudaut C, Saenz A, Pogue R, Grimbergen Je, Anderson Lv, et al. Calpainopathy-a survey of mutations and polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1524-40.
- [29] Zatz M, Starling A. Calpains and disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 2413-23.
- [30] Brook Jd, Mcurrach 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: 385.
- [31] Liquori Cl, Ricker K, Moseley Ml, Jacobsen Jf, Kress W, Naylor Sl, et al. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 2001; 293: 864-7.
- [32] Cho Dh, Tapscott Sj. Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772: 195-204.
- [33] Davies Je, Berger Z, Rubinsztein Dc. Oculopharyngeal muscular dystrophy: potential therapies for an aggregate-associated disorder. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 1457-62.
- [34] Tupler R, Gabellini D. Molecular basis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 557-66.
- [35] Tawil R. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2004; 4: 51-4.
- [36] Olovnikov Am. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 1973; 41: 181-90.
- [37] Decary S, Mouly V, Hamida Cb, Sautet A, Barbet Jp, Butler-Browne Gs. Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1429-38.
- [38] Jasmin G, Tautu C, Vanasse M, Brochu P, Simoneau R. Impaired muscle differentiation in explant cultures of Duchenne muscular dystrophy. *Lab Invest* 1984; 50: 197-207.
- [39] Melone Ma, Peluso G, Petillo O, Galderisi U, Cotrufo R. Defective growth *in vitro* of Duchenne Muscular Dystrophy myoblasts: the molecular and biochemical basis. *J Cell Biochem* 1999; 76: 118-32.
- [40] Bigot A, Klein Af, Gasnier E, Jacquemin V, Ravassard P, Butler-Browne G, et al. Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells. *Am J Pathol* 2009; 174: 1435-42.
- [41] Anderson Je. A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 1859-74.
- [42] Brenman Je, Chao Ds, Xia H, Aldape K, Brecht Ds. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1995; 82: 743-52.
- [43] Lee Kh, Baek My, Moon Ky, Song Wk, Chung Ch, Ha Db, et al. Nitric oxide as a messenger molecule for myoblast fusion. *J Biol Chem* 1994; 269: 14371-4.
- [44] Anderson J, Pilipowicz O. Activation of muscle satellite cells in single-fiber cultures. *Nitric Oxide* 2002; 7: 36-41.
- [45] Froehner Sc. Just say NO to muscle degeneration? *Trends Mol Med* 2002; 8: 51-3.
- [46] Heydemann A, McNally Em. Regenerating more than muscle in muscular dystrophy. *Circulation* 2004; 110: 3290-2.
- [47] Barton Er, Morris L, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney Hl. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol* 2002; 157: 137-48.
- [48] Celotto Am, Frank Ac, Mcgrath Sw, Fergestad T, Van Voorhies Wa, Buttle Kf, et al. Mitochondrial encephalomyopathy in *Drosophila*. *J Neurosci* 2006; 26: 810-20.
- [49] Chartier A, Benoit B, Simonelig M. A *Drosophila* model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *EMBO J* 2006; 25: 2253-62.
- [50] Shcherbata Hr, Yatsenko As, Patterson L, Sood Vd, Nudel U, Yaffe D, et al. Dissecting muscle and neuronal disorders in a *Drosophila* model of muscular dystrophy. *EMBO J* 2007; 26: 481-93.
- [51] Taghli-Lamalle O, Akasaka T, Hogg G, Nudel U, Yaffe D, Chamberlain Js, et al. Dystrophin deficiency in *Drosophila* reduces lifespan and causes a dilated cardiomyopathy phenotype. *Aging Cell* 2008; 7: 237-49.
- [52] Xu Y, Condell M, Plesken H, Edelman-Novemsky I, Ma J, Ren M, et al. A *Drosophila* model of Barth syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 11584-8.
- [53] Ocorr K, Reeves Nl, Wessells Rj, Fink M, Chen Hs, Akasaka T, et al. KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in *Drosophila* that mimic the effects of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 3943-8.
- [54] Carre-Pierrat M, Grisoni K, Gieseler K, Mariol Mc, Martin E, Jospin M, et al. The SLO-1 BK channel of *Caenorhabditis elegans* is critical for muscle function and is involved in dystrophin-dependent muscle dystrophy. *J Mol Biol* 2006; 358: 387-95.
- [55] Gregorevic P, Blankinship Mj, Allen Jm, Chamberlain Js. Systemic microdystrophin gene delivery improves skeletal muscle structure and function in old dystrophic mdx mice. *Mol Ther* 2008; 16: 657-64.
- [56] Wang Z, Kuhr Cs, Allen Jm, Blankinship M, Gregorevic P, Chamberlain Js, et al. Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Mol Ther* 2007; 15: 1160-6.
- [57] Denti Ma, Rosa A, D'antona G, Sthandier O, De Angelis Fg, Nicoletti C, et al. Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 3758-63.
- [58] Goyenville A, Babbs A, Van Ommen Gj, Garcia L, Davies Ke. Enhanced exon-skipping induced by U7 snRNA carrying a splicing silencer sequence: Promising tool for DMD therapy. *Mol Ther* 2009; 17: 1234-40.
- [59] Gaud A, Simon Jm, Witzel T, Carre-Pierrat M, Wermuth Cg, Segalat L. Prednisone reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Neuromuscul Disord* 2004; 14: 365-70.
- [60] Gieseler K, Grisoni K, Segalat L. Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 2000; 10: 1092-7.
- [61] Kucherenko Mm, Pantoja M, Yatsenko As, Shcherbata Hr, Fischer Ka, Maksymiv Dv, et al. Genetic modifier screens reveal new components that interact with the *Drosophila* dystroglycan-dystrophin complex. *PLoS One* 2008; 3: e2418.
- [62] Mankodi A, Logigian E, Callahan L, McClain C, White R, Henderson D, et al. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 2000; 289: 1769-73.
- [63] Kanadia Rn, Shin J, Yuan Y, Beattie Sg, Wheeler Tm, Thornton Ca, et al. Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscle-blind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 11748-53.
- [64] Wheeler Tm, Lueck Jd, Swanson Ms, Dirksen Rt, Thornton Ca. Correction of CIC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 2007; 117: 3952-7.
- [65] 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.

- [66] De Haro M, Al-Ramahi I, De Gouyon B, Ukani L, Rosa A, Faustino Na, *et al.* MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a Drosophila model of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 2138-45.
- [67] Garcia-Lopez A, Monferrer L, Garcia-Alcover I, Vicente-Crespo M, Alvarez-Abril Mc, Artero Rd. Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in Drosophila. *PLoS ONE* 2008; 3: e1595.
- [68] Chen Ky, Pan H, Lin Mj, Li Yy, Wang Lc, Wu Yc, *et al.* Length-dependent toxicity of untranslated CUG repeats on *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 774-9.
- [69] Bate M, Rushton E. Myogenesis and muscle patterning in Drosophila. *C R Acad Sci III* 1993; 316: 1047-61.
- [70] Dion P, Shanmugam V, Gaspar C, Messaed C, Meijer I, Toulouse A, *et al.* Transgenic expression of an expanded (GCG)₁₃ repeat PABPN1 leads to weakness and coordination defects in mice. *Neurobiol Dis* 2005; 18: 528-36.
- [71] Davies Je, Sarkar S, Rubinsztein Dc. Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 23-31.
- [72] Davies Je, Wang L, Garcia-Oroz L, Cook Lj, Vacher C, O'donovan Dg, *et al.* Doxycycline attenuates and delays toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in transgenic mice. *Nat Med* 2005; 11: 672-7.
- [73] Catoire H, Pasco My, Abu-Baker A, Holbert S, Tourette C, Brais B, *et al.* Sirtuin inhibition protects from the polyalanine muscular dystrophy protein PABPN1. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 2108-17.
- [74] Chartier A, Raz V, Sterenburg E, Verrips Ct, Van Der Maarel Sm, Simonelig M. Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy by muscular expression of Llama single-chain intrabodies *in vivo*. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 1849-59.
- [75] Marzetti E, Anne Lees H, Eva Wohlgemuth S, Leeuwenburgh C. Sarcopenia of aging: underlying cellular mechanisms and protection by calorie restriction. *Biofactors* 2009; 35: 28-35.
- [76] Combaret L, Dardevet D, Bechet D, Taillandier D, Mosoni L, Attaix D. Skeletal muscle proteolysis in aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12: 37-41.
- [77] Gopinath Sd, Rando Ta. Stem cell review series: aging of the skeletal muscle stem cell niche. *Aging Cell* 2008; 7: 590-8.
- [78] Conboy Im, Conboy Mj, Smythe Gm, Rando Ta. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 2003; 302: 1575-7.
- [79] Conboy Im, Conboy Mj, Wagers Aj, Girma Er, Weissman Il, Rando Ta. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 2005; 433: 760-4.
- [80] Renault V, Thornell Le, Butler-Browne G, Mouly V. Human skeletal muscle satellite cells: aging, oxidative stress and the mitotic clock. *Exp Gerontol* 2002; 37: 1229-36.
- [81] Ryall Jg, Schertzer Jd, Lynch Gs. Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness. *Biogerontology* 2008; 9: 213-28.
- [82] Kanisicak O, Mendez Jj, Yamamoto S, Yamamoto M, Goldhamer Dj. Progenitors of skeletal muscle satellite cells express the muscle determination gene, MyoD. *Dev Biol* 2009; 332: 131-41.
- [83] Alway Se, Degens H, Lowe Da, Krishnamurthy G. Increased myogenic repressor Id mRNA and protein levels in hindlimb muscles of aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282: R411-22.
- [84] Proctor Dn, Balagopal P, Nair Ks. Age-related sarcopenia in humans is associated with reduced synthetic rates of specific muscle proteins. *J Nutr* 1998; 128: 351S-55S.
- [85] Musaro A, Cusella De Angelis Mg, Germani A, Ciccarelli C, Molinaro M, Zani Bm. Enhanced expression of myogenic regulatory genes in aging skeletal muscle. *Exp Cell Res* 1995; 221: 241-8.
- [86] Yokota Y, Mori S. Role of Id family proteins in growth control. *J Cell Physiol* 2002; 190: 21-8.
- [87] Gundersen K, Merlie Jp. Id-1 as a possible transcriptional mediator of muscle disuse atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3647-51.
- [88] Gianni P, Jan Kj, Douglas Mj, Stuart Pm, Tarnopolsky Ma. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp Gerontol* 2004; 39: 1391-400.
- [89] Beccafico S, Puglielli C, Pietrangelo T, Bellomo R, Fano G, Fulle S. Age-dependent effects on functional aspects in human satellite cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1100: 345-52.
- [90] Fulle S, Di Donna S, Puglielli C, Pietrangelo T, Beccafico S, Bellomo R, *et al.* Age-dependent imbalance of the antioxidative system in human satellite cells. *Exp Gerontol* 2005; 40: 189-97.
- [91] Nair Ks. Aging muscle. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 953-63.
- [92] Khrapko K, Vijg J. Mitochondrial DNA mutations and aging: devils in the details? *Trends Genet* 2009; 25: 91-8.
- [93] Kujoth Gc, Hiona A, Pugh Td, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth Se, *et al.* Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 2005; 309: 481-4.
- [94] Corpas E, Harman Sm, Blackman Mr. Human growth hormone and human aging. *Endocr Rev* 1993; 14: 20-39.
- [95] Grounds Md. Reasons for the degeneration of ageing skeletal muscle: a central role for IGF-1 signalling. *Biogerontology* 2002; 3: 19-24.
- [96] Lewis Me, Neff Nt, Contreras Pc, Stong Db, Oppenheim Rw, Grebow Pe, *et al.* Insulin-like growth factor-I: potential for treatment of motor neuronal disorders. *Exp Neurol* 1993; 124: 73-88.
- [97] Giovannini S, Marzetti E, Borst Se, Leeuwenburgh C. Modulation of GH/IGF-1 axis: potential strategies to counteract sarcopenia in older adults. *Mech Ageing Dev* 2008; 129: 593-601.
- [98] Payne Am, Messi Ml, Zheng Z, Delbono O. Motor neuron targeting of IGF-1 attenuates age-related external Ca²⁺-dependent skeletal muscle contraction in senescent mice. *Exp Gerontol* 2007; 42: 309-19.
- [99] Payne Am, Zheng Z, Messi Ml, Milligan Ce, Gonzalez E, Delbono O. Motor neurone targeting of IGF-1 prevents specific force decline in ageing mouse muscle. *J Physiol* 2006; 570: 283-94.
- [100] Shefer G, Van De Mark Dp, Richardson Jb, Yablonka-Reuveni Z. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev Biol* 2006; 294: 50-66.
- [101] Zacks Si, Sheff Mf. Age-related impeded regeneration of mouse minced anterior tibial muscle. *Muscle Nerve* 1982; 5: 152-61.
- [102] Carlson Bm, Faulkner Ja. Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery. *Am J Physiol* 1989; 256: C1262-6.
- [103] Brennan Pa, Jing J, Ethunandan M, Gorecki D. Dystroglycan complex in cancer. *Eur J Surg Oncol* 2004; 30: 589-92.
- [104] Christov C, Chretien F, Abou-Khalil R, Bassez G, Vallet G, Authier Fj, *et al.* Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 1397-409.
- [105] Leptin M, Grunewald B. Cell shape changes during gastrulation in Drosophila. *Development* 1990; 110: 73-84.
- [106] Baker R, Schubiger G. Ectoderm induces muscle-specific gene expression in Drosophila embryos. *Development* 1995; 121: 1387-98.
- [107] Baylies Mk, Martinez Arias A, Bate M. wingless is required for the formation of a subset of muscle founder cells during Drosophila embryogenesis. *Development* 1995; 121: 3829-37.
- [108] Staehling-Hampton K, Hoffmann Fm, Baylies Mk, Rushton E, Bate M. dpp induces mesodermal gene expression in Drosophila. *Nature* 1994; 372: 783-6.
- [109] Baylies Mk, Bate M. twist: a myogenic switch in Drosophila. *Science* 1996; 272: 1481-4.
- [110] Azpiazu N, Lawrence Pa, Vincent Jp, Frasch M. Segmentation and specification of the Drosophila mesoderm. *Genes Dev* 1996; 10: 3183-94.
- [111] Tajbakhsh S, Cossu G. Establishing myogenic identity during somitogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7: 634-41.
- [112] Wu X, Golden K, Bodmer R. Heart development in Drosophila requires the segment polarity gene wingless. *Dev Biol* 1995; 169: 619-28.
- [113] Riechmann V, Irion U, Wilson R, Grosskortenhaus R, Leptin M. Control of cell fates and segmentation in the Drosophila mesoderm. *Development* 1997; 124: 2915-22.

- [114] Linker C, Lesbros C, Stark Mr, Marcelle C. Intrinsic signals regulate the initial steps of myogenesis in vertebrates. *Development* 2003; 130: 4797-807.
- [115] Kassar-Duchossoy L, Giacone E, Gayraud-Morel B, Jory A, Gomes D, Tajbakhsh S. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev* 2005; 19: 1426-31.
- [116] Halfon Ms, Carmena A, Gisselbrecht S, Sackerson Cm, Jimenez F, Baylies Mk, *et al.* Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal-activated and tissue-restricted transcription factors. *Cell* 2000; 103: 63-74.
- [117] Buff E, Carmena A, Gisselbrecht S, Jimenez F, Michelson Am. Signalling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor is required for the specification and diversification of embryonic muscle progenitors. *Development* 1998; 125: 2075-86.
- [118] Baylies Mk, Bate M, Ruiz Gomez M. Myogenesis: a view from *Drosophila*. *Cell* 1998; 93: 921-7.
- [119] Dohrmann C, Azpiazu N, Frasch M. A new *Drosophila* homeo box gene is expressed in mesodermal precursor cells of distinct muscles during embryogenesis. *Genes Dev* 1990; 4: 2098-111.
- [120] Knirr S, Azpiazu N, Frasch M. The role of the NK-homeobox gene slouch (S59) in somatic muscle patterning. *Development* 1999; 126: 4525-35.
- [121] Jagla T, Bellard F, Lutz Y, Dretzen G, Bellard M, Jagla K. ladybird determines cell fate decisions during diversification of *Drosophila* somatic muscles. *Development* 1998; 125: 3699-708.
- [122] Ruiz-Gomez M, Romani S, Hartmann C, Jackle H, Bate M. Specific muscle identities are regulated by Kruppel during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 1997; 124: 3407-14.
- [123] Borkowski Om, Brown Nh, Bate M. Anterior-posterior subdivision and the diversification of the mesoderm in *Drosophila*. *Development* 1995; 121: 4183-93.
- [124] Goulding M, Lumsden A, Paquette Aj. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* 1994; 120: 957-71.
- [125] Mennerich D, Schafer K, Braun T. Pax-3 is necessary but not sufficient for *lbx1* expression in myogenic precursor cells of the limb. *Mech Dev* 1998; 73: 147-58.
- [126] Jagla K, Dolle P, Mattei Mg, Jagla T, Schuhbaur B, Dretzen G, *et al.* Mouse *Lbx1* and human *LBX1* define a novel mammalian homeobox gene family related to the *Drosophila* lady bird genes. *Mech Dev* 1995; 53: 345-56.
- [127] Schafer K, Braun T. Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene *Lbx1h*. *Nat Genet* 1999; 23: 213-6.
- [128] Gross Mk, Moran-Rivard L, Velasquez T, Nakatsu Mn, Jagla K, Goulding M. *Lbx1* is required for muscle precursor migration along a lateral pathway into the limb. *Development* 2000; 127: 413-24.
- [129] Mankoo Bs, Collins Ns, Ashby P, Grigorieva E, Pevny Lh, Candia A, *et al.* *Mox2* is a component of the genetic hierarchy controlling limb muscle development. *Nature* 1999; 400: 69-73.
- [130] Sudarsan V, Anant S, Guptan P, Vijayraghavan K, Skaer H. Myoblast diversification and ectodermal signaling in *Drosophila*. *Dev Cell* 2001; 1: 829-39.
- [131] Mielcarek M, Gunther S, Kruger M, Braun T. VITO-1, a novel vestigial related protein is predominantly expressed in the skeletal muscle lineage. *Gene Expr Patterns* 2002; 2: 305-10.
- [132] Doberstein Sk, Fetter Rd, Mehta Ay, Goodman Cs. Genetic analysis of myoblast fusion: blown fuse is required for progression beyond the prefusion complex. *J Cell Biol* 1997; 136: 1249-61.
- [133] Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, Mccready P, Putaala H, *et al.* Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1: 575-82.
- [134] Donoviel Db, Freed Dd, Vogel H, Potter Dg, Hawkins E, Barrish Jp, *et al.* Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking *NEPH1*, a novel protein with homology to *NEPHRIN*. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 4829-36.
- [135] Shen K, Bargmann Ci. The immunoglobulin superfamily protein SYG-1 determines the location of specific synapses in *C. elegans*. *Cell* 2003; 112: 619-30.
- [136] Shen K, Fetter Rd, Bargmann Ci. Synaptic specificity is generated by the synaptic guidepost protein SYG-2 and its receptor, SYG-1. *Cell* 2004; 116: 869-81.
- [137] Srinivas Bp, Woo J, Leong Wy, Roy S. A conserved molecular pathway mediates myoblast fusion in insects and vertebrates. *Nat Genet* 2007; 39: 781-6.
- [138] Sohn Ri, Huang P, Kawahara G, Mitchell M, Guyon J, Kalluri R, *et al.* A role for nephrin, a renal protein, in vertebrate skeletal muscle cell fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 9274-9.
- [139] Reddien Pw, Horvitz Hr. CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 131-6.
- [140] Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kobayashi S, Sugimura H, Kurata T, Matsuda M. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev* 1998; 12: 3331-6.
- [141] Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kurata T, Sugimura H, Matsuda M. Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130(Cas) complex. *J Biol Chem* 1998; 273: 24479-84.
- [142] Moore Ca, Parkin Ca, Bidet Y, Ingham Pw. A role for the Myoblast city homologues Dock1 and Dock5 and the adaptor proteins Crk and Crk-like in zebrafish myoblast fusion. *Development* 2007; 134: 3145-53.
- [143] Laurin M, Fradet N, Blangy A, Hall A, Vuori K, Cote Jf. The atypical Rac activator Dock180 (Dock1) regulates myoblast fusion *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 15446-51.
- [144] Bate M. The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* 1990; 110: 791-804.
- [145] Volk T. Singling out *Drosophila* tendon cells: a dialogue between two distinct cell types. *Trends Genet* 1999; 15: 448-53.
- [146] Frommer G, Vorbruggen G, Pasca G, Jackle H, Volk T. Epidermal *egr*-like zinc finger protein of *Drosophila* participates in myotube guidance. *EMBO J* 1996; 15: 1642-9.
- [147] Becker S, Pasca G, Strumpf D, Min L, Volk T. Reciprocal signaling between *Drosophila* epidermal muscle attachment cells and their corresponding muscles. *Development* 1997; 124: 2615-22.
- [148] Vorbruggen G, Constien R, Zilian O, Wimmer Ea, Dowe G, Taubert H, *et al.* Embryonic expression and characterization of a Ptx1 homolog in *Drosophila*. *Mech Dev* 1997; 68: 139-47.
- [149] Yarnitzky T, Min L, Volk T. The *Drosophila* neuregulin homolog Vein mediates inductive interactions between myotubes and their epidermal attachment cells. *Genes Dev* 1997; 11: 2691-700.
- [150] Callahan Ca, Bonkovsky JI, Scully AI, Thomas Jb. derailed is required for muscle attachment site selection in *Drosophila*. *Development* 1996; 122: 2761-7.
- [151] Schnorrer F, Kalchauer I, Dickson Bj. The transmembrane protein Kon-tiki couples to Dgrip to mediate myotube targeting in *Drosophila*. *Dev Cell* 2007; 12: 751-66.
- [152] Kardon G. Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development* 1998; 125: 4019-32.
- [153] Ruiz Gomez M, Bate M. Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* requires numb. *Development* 1997; 124: 4857-66.
- [154] Anant S, Roy S, Vijayraghavan K. Twist and Notch negatively regulate adult muscle differentiation in *Drosophila*. *Development* 1998; 125: 1361-9.
- [155] Wolf C, Thisse C, Stoetzel C, Thisse B, Gerlinger P, Perrin-Schmitt F. The M-twist gene of *Mus* is expressed in subsets of mesodermal cells and is closely related to the *Xenopus* X-twi and the *Drosophila* twist genes. *Dev Biol* 1991; 143: 363-73.
- [156] Fernandes J, Bate M, Vijayraghavan K. Development of the indirect flight muscles of *Drosophila*. *Development* 1991; 113: 67-77.
- [157] Ghazi A, Anant S, Vijayraghavan K. Apterous mediates development of direct flight muscles autonomously and indirect flight muscles through epidermal cues. *Development* 2000; 127: 5309-18.
- [158] Soler C, Daczewska M, Da Ponte Jp, Dastugue B, Jagla K. Coordinated development of muscles and tendons of the *Drosophila* leg. *Development* 2004; 131: 6041-51.
- [159] Dutta D, Anant S, Ruiz-Gomez M, Bate M, Vijayraghavan K. Founder myoblasts and fibre number during adult myogenesis in *Drosophila*. *Development* 2004; 131: 3761-72.

- [160] Dutta D, Shaw S, Maqbool T, Pandya H, Vijayraghavan K. *Drosophila* Heartless acts with Heartbroken/Dof in muscle founder differentiation. *PLoS Biol* 2005; 3: e337.
- [161] Rushton E, Drysdale R, Abmayr Sm, Michelson Am, Bate M. Mutations in a novel gene, myoblast city, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development* 1995; 121: 1979-88.
- [162] Figeac N, Daczewska M, Marcelle C, Jagla K. Muscle stem cells and model systems for their investigation. *Dev Dyn* 2007.
- [163] Bate M, Rushton E, Currie Da. Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*. *Development* 1991; 113: 79-89.
- [164] Farrell Er, Keshishian H. Laser ablation of persistent twist cells in *Drosophila*: muscle precursor fate is not segmentally restricted. *Development* 1999; 126: 273-80.
- [165] Roy S, Vijayraghavan K. Homeotic genes and the regulation of myoblast migration, fusion, and fibre-specific gene expression during adult myogenesis in *Drosophila*. *Development* 1997; 124: 3333-41.
- [166] Figeac N, Daczewska M, Marcelle C, Jagla K. Muscle stem cells and model systems for their investigation. *Dev Dyn* 2007; 236: 3332-42.
- [167] Golding Jp, Calderbank E, Partridge Ta, Beauchamp Jr. Skeletal muscle stem cells express anti-apoptotic ErbB receptors during activation from quiescence. *Exp Cell Res* 2007; 313: 341-56.
- [168] Watanabe S, Kondo S, Hayasaka M, Hanaoka K. Functional analysis of homeodomain-containing transcription factor Lbx1 in satellite cells of mouse skeletal muscle. *J Cell Sci* 2007; 120: 4178-87.

Received: November 17, 2009

Accepted: December 10, 2009